

*Aus der Medizinischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. K. Ullrich*

Untersuchungen über die Brauchbarkeit der
»Methylenblauprobe«
als Schnelltest für die klinische Pansensaft-
untersuchung beim Rind

Inauguraldissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tiermedizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Dirk Mahler aus Ostrowo
München 1970

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553801_0077

*Aus der Medizinischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. K. Ullrich*

Untersuchungen über die Brauchbarkeit der
»Methylenblauprobe«
als Schnelltest für die klinische Pansensaft-
untersuchung beim Rind

Inauguraldissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tiermedizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Dirk Mahler aus Ostrowo

München 1970



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent Prof. Dr. Dr. h. c. K. Ullrich

Korreferent Wiss. Rat Dr. D. Giesecke

Tag der Promotion 5. Februar 1971

Inhalt

EINLEITUNG	7
SCHRIFTTUM	
Die Biochemie der Pansenverdauung	
a) Allgemeines zur Pansenverdauung	8
b) Biochemie der Pansenverdauung	10
Das Wesen der Redoxsysteme	14
Redoxsysteme im biologischen Milieu	15
Das Redoxpotential im Pansen gesunder Wiederkäuer	17
Bisherige Untersuchungen über das Verhalten des Redoxpotentials bei verschiedenen Störungen der biochemischen Vormagenverdauung	22
Das Wesen der Methylenblaureduktion	24
Bisherige Anwendung von Redoxfarbstoffen im biologischen Test	26
EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
Versuchstiere	30
Untersuchungstechnik:	
Pansensaftentnahme, -untersuchung und -beurteilung	30
Durchführung der Methylenblauprobe	31
Versuchsanordnung	32
Vorversuche mit wechselnden Methylenblaumengen zur Einstellung der Methylenblauprobe als „Schnelltest“	33
Vorversuche an inaktiviertem Panseninhalt	34
Verlauf der Methylenblaureduktion bei unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen des abgesaugten Pansensaftes sowie im zeitlichen Abstand von der Pansensaft-Entnahme.	35
	5

Verlauf der Methylenblaureduktion bei Verfütterung einer gemischten Ration.	36
Verlauf der Methylenblaureduktion bei Heufütterung	40
Verlauf der Methylenblaureduktion bei Strohütterung	48
Verlauf der Methylenblaureduktion nach intraruminaler Verabreichung von Chlortetrazyklin in steigender Dosis.	52
Verlauf der Methylenblaureduktion bei experimentell erzeugter Pansenazidose	58
Verlauf der Methylenblaureduktion bei experimentell erzeugter Pansenazidose ohne und mit Neutralisation des entnommenen Vormageninhaltes	63
BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	67
ZUSAMMENFASSUNG	70
LITERATURVERZEICHNIS	74

Einleitung

Während die Vormagenforschung anfangs vorwiegend die motorischen Funktionen und ihre Störungen zum Gegenstand hatte, hat sie sich in den vergangenen drei Jahrzehnten mehr und mehr der Physiologie und Pathologie der biochemischen Digestionsprozesse zugewandt. Die Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, daß bestimmte Vormagenerkrankungen ihre Ursache in krankhaften Verschiebungen der Vormagenflora und -fauna haben (ROSENBERGER, 1963 und 1969).

Es ist das Verdienst Hoflunds, diese Gruppe von Vormagenstörungen aus dem früher sehr umfassenden Begriff der »Indigestionen des Rindes« herausgelöst zu haben. Zur Erkennung dieser primär alimentären (biochemischen) Indigestionen wurde von Hoflund und seiner Schule die systematische Untersuchung abgesaugter Pansensaftproben in die klinische Diagnostik der Vormagenkrankheiten eingeführt.

Im Rahmen dieser Entwicklung hat BROBERG (1957, 1958) auch elektrometrische Untersuchungen über das Redoxpotential im Panseninhalt gesunder und vormagenkranker Rinder vorgenommen. Hierfür ist allerdings eine gewisse apparative Ausstattung erforderlich, so daß solche Messungen Speziallaboren vorbehalten bleiben müssen. Um eine Vereinfachung für die Anwendung derartiger Proben in der tierärztlichen Landpraxis zu erzielen, wurden von DIRKSEN (1965) für diesen Zweck die Redoxfarbstoffe, insbesondere das Methylenblau, herangezogen.

Mir wurde die Aufgabe übertragen, diese sogenannte „Methylenblauprobe“ unter verschiedenen Fütterungs- und pH-Bedingungen im Experiment an Pansenfistelkühen zu prüfen. Zugleich sollte der anfangs mit relativ großen Methylenblaumengen ausgeführte und daher verhältnismäßig langsam ablaufende Reduktionstest auf kürzere Normalzeiten eingestellt werden. Zuletzt sollte die Frage nach der Brauchbarkeit dieser Probe als „Schnelltest“ für die klinische Pansensaftuntersuchung erörtert werden.

Schrifttum

Die Biochemie der Pansenverdauung

a) Allgemeines zur Pansenverdauung

Die klinische Sonderstellung des Rindes liegt vor allem in den Eigenheiten seiner Verdauungsorgane begründet. Zum Verständnis der Biochemie der Pansenverdauung und deren Störungen sind Kenntnisse der Anatomie sowie der Umweltfaktoren des mikrobiellen Lebensraumes Voraussetzung.

Der Pansen, ein Teil des mehrhöhligen Magens der Wiederkäuer, ist die größte Vormagenabteilung. Der Panseninhalt macht 10-15 % des Körpergewichtes aus. Seine Innenwand ist mit kutaner Schleimhaut ausgekleidet, vollständig mit Zotten verschiedener Größe bedeckt und besitzt keine Drüsen. Die Vormagenverdauung erfolgt durch die chemische Leistung mannigfaltiger Bakterien- und Protozoenarten, die im Pansen ausgezeichnete Lebensbedingungen vorfinden und in enger Symbiose miteinander stehen (ROLLE und PESCHEK, 1956). Die laufende Zufuhr von Nährstoffen und Beseitigung von Stoffwechselprodukten durch Resorption und Passage kennzeichnen den Pansen als offenes System, dessen Nahrungsaufschlüsselung und -verdauung vom Metabolismus seiner Pansenbewohner abhängig ist. Die Zahl der Pansenbakterien hängt vom Nährstoffangebot ab und schwankt zwischen $5-50 \times 10^9$ Keimen pro ml Pansensaft, wobei sich durchschnittlich 17 % (12 % bis max. 25 %) (ORTH und KAUFMANN, 1961) der Gesamtbakterienzahl im Pansensaft befinden und der Rest den festen Bestandteilen des Panseninhaltes anhaftet. Bei rohfaserreicher Fütterung ist die Bakterienfrischmasse, bei Annahme eines Trockensubstanzgehaltes der Bakterien von etwa 10 %, deutlich vermindert (Mittelwerte 2,8 – 3,5 kg) gegenüber stärkereicher Nahrung (Mittelwerte 5,6 – 6,7 kg) (ORTH und KAUFMANN, 1961).

Neben den Bakterien spielen die Protozoen bei der Verarbeitung und Aufschlüsselung der Nahrung eine gewisse Rolle. Zwar können die Wirtstiere auch ohne Protozoen leben (MANGOLD, 1929), doch sind die Infusorien fähig, hochwertiges, arteigenes Eiweiß aus von ihnen aufgenommenen und verdauten Bakterien und aus den Aminosäuren des Futters aufzubauen (KOLB, 1959 und 1962). Werden die Protozoen letztlich verdaut, dienen sie dem Tier

als zusätzliche Proteinquelle. Sie können Polysaccharide speichern und dienen durch ihre Eigenbewegung der Durchmischung des Panseninhaltes. Ihre Zahl beläuft sich auf ungefähr $10^5 - 10^6$ /g Panseninhalt, ihre Größe schwankt zwischen $20\ \mu$ und $200\ \mu$; ihre Zahl ist zudem stark abhängig von der Fütterung: im Hungerzustand verschwinden sie in 3 bis 4 Tagen (HOFLUND, 1959). Der Pansen der Wiederkäuer stellt ein offenes System dar. Als begrenzende Faktoren sind der extrem niedrige Sauerstoffgehalt und die Art der mit dem Futter zugeführten Nährstoffe anzusehen, die im Pansen zu einer außerordentlichen Konstanz bestimmter Faktoren führen:

So beträgt das spezifische Gewicht des Panseninhaltes im Durchschnitt 1,038 bis 1,039 mit einer Spanne von 1,022 bis 1,055, bedingt durch die Futterzusammensetzung und abhängig vom Ort der Messung (BALCH und KELLY, 1950).

Die Temperatur im Pansen beträgt im allgemeinen $39-40^\circ\text{C}$ (BROBERG, 1957) bzw. nach in verschiedenen Bereichen des Pansens durchgeführten Messungen von BRODY, STEWART und DALE (1955) $38-40^\circ\text{C}$. GILCHRIST und CLARK (1957) konnten Temperaturen bis 41°C bei aktiver Fermentation von Luzerne-Heu nachweisen. DALE, BRODY und STEWART (1954) ermittelten Abweichungen zwischen der Pansensafttemperatur und gleichzeitig rektal gemessenen Werten. Nach Aufnahme größerer Wassermengen mit einer Temperatur von 25°C stellten CUNNINGHAM, MARTZ und MERILAN (1964) Temperaturen zwischen 5 bis 10°C unter der normalen Pansentemperatur fest.

Der pH-Wert des Pansens hängt in der Regel von der Futterzusammensetzung und dem Zeitpunkt der Messung nach der Futteraufnahme ab (PHILIPSON, 1942). Abweichungen vom pH-Wert sind durch die Produktion organischer Säuren und die unterschiedlichen Mengen abgeschluckten Speichels gegeben. BRIGGS, HOGAN und REID (1957) stellte bei Schafen ein Absinken des pH-Wertes 2 bis 6 Stunden nach der Fütterung auf 5,2 bis 5,45 fest, bei Verfütterung leicht verdaulicher Kohlenhydrate auf ein Minimum von 4,35 und verzeichneten bei rohfaserreicher Fütterung pH-Werte bis 7,3. Übereinstimmend heben mehrere Autoren hervor, daß der pH-Wert im Pansen im dorsalen, cranialen Pansensack höher liegt als an anderen Stellen, was auf die unmittelbare Berührung des Pansensaftes mit dem Speichel an dieser Stelle zurückzuführen ist.

Die Pufferkapazität des Pansens wird durch die Speichelkarbonate und -phosphate auf der einen Seite und durch die kontinuierlich im Pansen gebildeten flüchtigen Fettsäuren (FFS) auf der anderen Seite aufrechterhalten. Auf

diese Weise ist der Pansensaft zwischen pH 5,8 und 7,5 gut abgepuffert; jenseits dieser pH-Werte erschöpft sich jedoch die Pufferkapazität rasch, wie durch Titration mit Salzsäure oder Natronlauge nachgewiesen werden kann (MYBURGH und QUIN, 1943).

Die Feuchtigkeit oder auch das wäßrige Milieu im Pansen setzt sich zusammen aus dem Speichel, der täglich in einer Menge von 90 bis zu 180 Litern sezerniert und abgeschluckt wird (KAUFMANN und ORTH, 1966), die rauen Nahrungspartikel anfeuchtet und einschleimt und gleichzeitig für eine entsprechende Verdünnung der Futterbestandteile im Pansen sorgt und zweitens aus der täglich aufgenommenen Wassermenge, die abhängig ist von der Umwelttemperatur und von der Art der aufgenommenen Nahrung. Daneben dient der Pansensaft als Elektrolytspeicher, wobei die Ionenzusammensetzung durch verschiedene Transportsysteme geregelt wird. So erhöht sich der Wasserbedarf bei einem hohen Elektrolytgehalt und bei Aufnahme eiweißhaltiger Nahrungsstoffe, da zur Ausscheidung von Stickstoffverbindungen und Salzen über den Harn größere Wassermengen benötigt werden. Durch ständig neue Aufschwemmung der Futterbestandteile hält der Pansensaft den intensiven Stoffwechsel der Bakterien und Protozoen aufrecht.

b) Biochemie der Pansenverdauung

Im Vordergrund aller Verdauungsprozesse im Hauben-Pansenraum steht die bakterielle Vergärung der schwer- und leichtlöslichen Kohlenhydrate. Daneben werden auch die Proteine und Fette bis zu einem gewissen Grade gespalten. Dazu kommen die speziellen synthetischen Leistungen der Mikroben, soweit sie für den Wirtsorganismus von Bedeutung sind. Hierzu zählt die Synthese von wasserlöslichen Vitaminen und von Zelleiweiß, auch aus anorganischen Stickstoff- und Schwefelquellen. Jedem Aufgabenbereich sind spezielle Keimarten der mikrobiellen Pansenpopulation zugeordnet, so z. B. Zellulolyten, Amylolyten, lactilytische Bakterien und Methanbildner, die in zum Teil noch ungeklärten Wechselbeziehungen zueinander stehen.

Die Pansenbakterien verdauen dabei 70–85% der verdaulichen Trockensubstanz des Futters schon im Pansen (GIESECKE und TIEWS, 1966). Stickstoffverbindungen und lösliche Kohlenhydrate werden fast vollständig umgesetzt, wogegen an der Verdauung der pflanzlichen Gerüstsubstanzen auch die Bakterienflora des Caecums maßgeblich mitbeteiligt ist (BRÜGGEMANN und GIESECKE, 1963). Die Hauptwege des Nahrungsabbaus im Pansen sind zwar

bekannt, hinsichtlich einzelner Reaktionen bestehen aber noch zahlreiche offene Fragen.

Kohlenhydratstoffwechsel

Die von den Wiederkäuern aufgenommenen Kohlenhydrate – Zellulose, Hemizellulose, Stärke, Mono- und Disaccharide, Pentosane, Xylane und Pektinstoffe – werden in den Vormägen ausschließlich durch Mikroorganismen zu 54 bis 95 % ab- bzw. umgebaut (ANNISON und LEWIS, 1959; HEILEMANN, 1960). Als Abbauprodukte entstehen niedere Fettsäuren, die über die Pansenwand resorbiert und im intermediären Stoffwechsel verwendet werden. Daneben entstehen CO_2 und H_2 .

Zunächst wird die Zellulose depolymerisiert und über Hexosephosphat und den Glykolyseweg zu Pyruvat abgebaut. Von hier aus führen differenzierte Stoffwechselwege zu Essig-, Propion-, Butter-, Milch-, Ameisensäure und Gasen (CO_2 , H_2 , CH_4).

Der prozentuale Anteil der einzelnen Säuren an der Gesamtmenge hängt maßgeblich von der Art des gebotenen Futters ab. Bei ausgewogener Ration entstehen etwa 60 Mol % Essigsäure, 20 Mol % Propionsäure und 15 Mol % Buttersäure, wobei die flüchtigen Fettsäuren mehr als $\frac{3}{4}$ des Energiebedarfs decken können.

Bei reiner Heufütterung kann der Essigsäureanteil auf über 70 Mol % steigen und nach Verfütterung leicht verdaulicher Kohlenhydrate auf 40 bis 60 Mol % absinken.

Bei Verfütterung von frischem Gras wurden 36 Mol % Essigsäure neben 38 Mol % Propionsäure ermittelt (BARNETT, 1957). Einen Anstieg der Propion- und Buttersäuremengen findet man bei geringen Rauhfutter- und hohen Kraftfuttermengen. Reichliche Eiweißfütterung führte zu einem Anstieg des Buttersäureanteils (MEYER, 1960). ORTH und KAUFMANN (1961) glauben, daß bei der Verfütterung von leicht verdaulichen Kohlenhydraten der pH-Abfall die Entstehung der Propionsäure über die Oxalessigsäure oder die Bildung von Buttersäure über die Kondensation von Essigsäuremolekülen fördere. Die sich ständig bildende Milchsäure wird sofort zu flüchtigen Fettsäuren abgebaut. Nach übermäßiger Verabreichung von leichtlöslichen Kohlenhydraten, wie Stärke, Zucker, z. B. bei Verfütterung von Weizen, Maisstärke oder Zuckerrüben, kann es zu einer Vermehrung der Laktobazillen kommen, was mit einer erheblichen Milchsäureanreicherung verbunden ist (HUNGATE,

DOUGHERTY, BRYANT und CELLO, 1952; PHILLIPSON und McANALLY, 1942; BROBERG, 1959; DAIN, NEAL und DOUGHERTY, 1955; KROGH, 1959/60/61, 1963; DIRKSEN, 1965, 1966, 1967; MACKENZIE, 1967).

Die entstehenden Gase CO_2 und H_2 werden teils zu Methan umgesetzt und mit dem Ruktus aus dem Pansen abgegeben (SMITH und HUNGATE, 1958).

Die flüchtigen Fettsäuren werden über die Pansenwand resorbiert und nehmen den Weg zur Leber. Propionsäure, Milchsäure und die Valeriansäure unterstützen dort im Zuge der Glukoneogenese den Aufbau von Glukose und Glykogen. Anders das Azetat und das β -Hydroxybutyrat, das in der Pansenwand aus Buttersäure gebildet wird: Sie gehen hauptsächlich in den peripheren Stoffwechsel (Depotfett, Milchfett, Energie) (ANNISON, 1954 und 1957; CARROL und HUNGATE, 1954).

Abbau von Stickstoffverbindungen

Der Abbau von stickstoffhaltigen Verbindungen im Pansen erfolgt zum einen aus pflanzlichen Eiweißkörpern, die mit der Nahrung eingebracht werden. Zum anderen sind die Vormagenmikroben befähigt, aus stickstoffhaltigen Verbindungen, die keinen Eiweißcharakter besitzen, wie Ammoniumsalze, Harnstoff und Biuret, Bakterieneiweiß zu synthetisieren.

Die pflanzlichen Eiweißkörper werden bei einem pH-Optimum zwischen 6 und 7 durch proteolytische Bakterien über Polypeptide in Aminosäuren übergeführt. Die Aminosäuren stehen zum einen direkt der Biosynthese körpereigenen Eiweißes zur Verfügung, zum anderen können sie zu Ammoniak, Kohlendioxyd und flüchtigen Fettsäuren desaminiert werden, wobei der Ammoniak der Leber zur Synthese von nichtessentiellen Aminosäuren zur Verfügung steht (ORTH und KAUFMANN, 1961). Bei der Desaminierung bestimmter Aminosäuren, wie z. B. Asparaginsäure und Alanin, entstehen neben Ammoniak Essigsäure und Propionsäure, die als Metaboliten im Kohlenhydratstoffwechsel verarbeitet werden können (MEYER, 1958).

Entsteht bei der Proteolyse pflanzlichen Eiweißes oder bei der Spaltung nicht-eiweißhaltiger Stickstoffverbindungen zuviel Stickstoff, der im Körper nicht verwendet werden kann, so wird dieser Stickstoff in der Leber in Harnstoff umgesetzt. Der Harnstoff wird nun über den Speichel und über den Blutkreislauf immer wieder dem Pansen zugeführt. Dieses System des „ruminohepatischen Kreislaufs“ stellt damit eine große Stickstoff-Reserve für den Wiederkäuer dar.

Nach neuesten Untersuchungen können Zelluloseabbau und Proteinsynthese im Pansen in positiver Stickstoffbilanz gehalten werden, wenn Zellulose als einzige Energiequelle und Harnstoff als einzige Stickstoffquelle im Futter zur Verfügung stehen (GIESECKE und TIEWS, 1966).

Fettstoffwechsel

Eine untergeordnete Rolle bei der Verdauung im Wiederkäuermagen spielt der Fettstoffwechsel, da nur ein geringer Prozentsatz an Fetten mit der Nahrung zugeführt wird. Durch Lipasen werden die langkettigen Fettsäuren vom Glycerin abgetrennt. Während der Glycerin zu flüchtigen Fettsäuren, vor allem zu Propionsäure, umgewandelt, der Leber zur Glukosebildung zur Verfügung steht, werden die Fettsäuren im Darm mit Gallenstoffen emulgiert und in die Blut- und Lymphbahn resorbiert. In dieser Form werden sie im intermediären Stoffwechsel zur Fettsynthese herangezogen oder durch Aktivierung mit Co-A und anschließender β -Oxydation in den Zitratzyklus eingeschleust.

Synthetisch-fermentative Eigenleistungen der Bakterien

Für den Wiederkäuer sind 2 Synthesen seiner Pansenbakterien, der Aufbau zelleigenen Proteins und die Bildung von Vitaminen, von grundlegender Bedeutung.

Der beim Abbau der Proteine, Aminosäuren und nicht-eiweißhaltigen Stickstoffverbindungen entstehende Ammoniak wird von den Bakterien zum Aufbau arteigenen Proteins benutzt, wobei zum Aufbau des Bakterieneiweißes auch essentielle Aminosäuren synthetisiert werden. Hierdurch wird der Wiederkäuer hinsichtlich des Gehaltes an essentiellen Aminosäuren unabhängig von der Menge und dem biologischen Wert des Eiweißes im Futter. Die Höhe dieser Versorgung des Wirtsmechanismus hängt einerseits von der Art und der Zahl, andererseits von der Menge verdauter Bakterien im Darm ab. (ORTH und KAUFMANN, 1961). Obwohl der Wiederkäuer seinen Eiweißbedarf zu 100% aus nichteiweißhaltigen Stickstoffverbindungen decken könnte, soll unter praktischen Verhältnissen jedoch nicht mehr als $\frac{1}{3}$ durch Ammoniumsalze, Harnstoff oder Biuret gedeckt werden (KIRCHGESSNER, 1970).

Die Vitamin-Eigensynthese der Bakterienflora ermöglicht es dem Wieder-

käuer, seinen Bedarf an wasserlöslichen Vitaminen und dem fettlöslichen Vitamin K größtenteils zu decken. Zur mikrobiellen Bildung von Vitamin B₁₂ und B₁₂-Analogen ist die Anwesenheit von Kobalt, einem Bestandteil des Vitaminmoleküls, Voraussetzung. Gleichzeitig ist das Ausmaß der Vitaminsynthese abhängig von der Art und der Zusammensetzung des Futters: mit zunehmender Güte des Heus und steigendem Anteil von Stärke im Futter wird die Synthese von Vitamin B₂ (Riboflavin) angeregt, ebenso diejenige des Vitamins Pantothersäure (ROSENBERGER, 1969).

Das Wesen der Redoxsysteme

In der Technik stellt die Oxydation von Kohlenstoff zu Kohlendioxyd unter starker Temperaturerhöhung und Wärmeentwicklung den hervorragendsten energieliefernden Prozeß dar. Der wichtigste energieliefernde Vorgang bei der biologischen Oxydation dagegen ist der Elektronentransport in der Atmungskette, der schließlich zur Vereinigung von Wasserstoff und Sauerstoff führt. Dabei erhält der Körper einen Teil der Energie in Form energiereicher Verbindungen (ATP), die ihm als chemische Energie verfügbar bleiben (KARLSON, 1966).

Die Dehydrierung im biologischen Milieu stellt somit nichts anderes dar als eine Oxydation durch Wasserstoff- bzw. Elektronenentzug. Hierbei erfolgt eine Dissoziation zweier Protonen bei gleichzeitigem Entzug zweier Elektronen. Die Elektronen werden entweder direkt auf den Sauerstoff als Elektronenakzeptor oder auf prosthetische Gruppen, wie sie in biologischer Lösung Fermente oder Enzyme darstellen, übertragen. Mit der Oxydation des einen Partners ist immer die Reduktion des zweiten gekoppelt, weshalb im allgemeinen von einer Redoxreaktion eines Redoxpaares gesprochen wird (DANE und WILLE, 1961).

Da in Redoxsystemen Elektronen übertragen werden, ist es denkbar, diese Elektronen nicht direkt auf einen Partner einwirken zu lassen, sondern sie durch einen Draht zu transportieren. Dadurch wird eine Spannung erzeugt, deren Höhe von den Teilreaktionen der beiden Redoxpaare abhängig ist und Potentialdifferenz genannt wird (DANE und WILLE, 1961).

Um Spannungsvergleiche innerhalb der Redoxsysteme zu ermöglichen, wird die Potentialdifferenz durch eine Bezugs elektrode in Form der Wasserstoffelektrode bei pH 0 standardisiert. Die darauf bezogenen Potentiale werden

als Normalpotentiale bezeichnet. Liegt dabei das Redoxsystem im Verhältnis 1:1, bezogen auf die Wasserstoffelektrode, vor, so spricht man von einem Normalpotential E_0 für dieses System. Wird E_0 bei pH 7 gemessen, so wird es mit E_0' dargestellt. Werden Redoxelektrode und Wasserstoffelektrode von Flüssigkeiten unterschiedlichen pH-Wertes umgeben, so ist das Redoxpotential E_h das Maß für die Spannung zwischen den Elektroden. Dabei ist E_h abhängig von E_0 und vom jeweiligen pH der Redoxlösung; die Voltzahlen liegen um so höher, je höher die H^+ -Konzentration ist. Da aber gewöhnlich nicht gegen die Wasserstoffelektrode gemessen wird, sondern in einer Kette, bestehend aus blankem Platin in der fraglichen Flüssigkeit und einer in sie eintauchenden Kalomelektrode, liegen die so gemessenen Redoxpotentiale E_k stets um 250 mV negativer als die dazugehörigen E_h -Werte ($E_h = E_k + 250$). Soll das Redoxpotential unabhängig vom pH sein, so setzt sich E aus E_h und dem bekannten pH-Wert, multipliziert mit einem Faktor ϑ zusammen: $E = E_h + pH \cdot \vartheta$. Zur Charakterisierung biologischer Redoxverhältnisse wird heute gerne das Symbol rH verwandt. Als Maßstab für die Reduktionskraft des jeweiligen Substrats ist rH dem negativen Logarithmus des Gleichgewichtsdruckes von Wasserstoff, $-\log p_2$, gleich und stellt das Redoxpotential E_h bei verschiedenen pH-Werten dar. Es wird durch die Potentialdifferenz zwischen der Sauerstoff- und der Wasserstoffelektrode begrenzt:

$$rH = \frac{E_h + pH \cdot \vartheta}{28,5} \quad (\text{NETTER, 1951}).$$

Im biologischen Milieu interessiert weniger die Reaktion mit atomarem Wasserstoff oder Sauerstoff, als vielmehr die Reaktion mit einem zweiten Reduktions- bzw. Oxydationsmittel, wobei Redox-Indikatoren die Beendigung des Oxydationsvorganges und das Einpendeln in ein Redoxgleichgewicht anzeigen. In einem solchen Falle ist die Differenz der Redoxpotentiale maßgebend für die freigesetzte Energie (DANE und WILLE, 1961).

Redoxsysteme im biologischen Milieu

Wie die Standardwerte der freien Energie sind die Redoxpotentiale auf die Standardkonzentration von oxydiertem und reduziertem Reaktionspartner bezogen und damit auf die Konzentration von $H^+ = 1$, pH = 0. Da an den meisten biochemischen Redoxreaktionen Wasserstoff-Ionen beteiligt sind,

müßte man $H^+ = 1$ machen, d. h. bei pH 0 messen, um die Standardpotentiale zu erhalten. Da bei pH = 0 die Enzyme inaktiv sind, wurde für biochemische Prozesse pH 7 als „Nullpunkt der biochemischen Redoxskala“ (KARLSON, 1966) gewählt, wobei jedoch zwischen der Wasserstoffelektrode bei pH 7 und derjenigen bei pH 0 ein Potentialgefälle von -42 V zugrunde gelegt werden muß.

Ein einfaches Redoxsystem im biologischen Milieu liegt dem Glutathion zugrunde, das unter Dehydrierung den Wasserstoff leicht abgibt und dabei selbst in die Disulfidform übergeht (SCHEUNERT und TRAUTMANN, 1965). Im Pflanzenreich und bei den mikrobiellen Verdauungsprozessen ist Glutathion als Co-Enzym der Glyoxylase maßgeblich im Glyoxylsäurezyklus an der Resynthese der Oxalessigsäure zur Aufrechterhaltung des Zitronensäurezyklus beteiligt (KARLSON, 1966). Im Zitronensäurezyklus spielen sich Redox-Reaktionen ab, die durch ein stufenweises Potentialgefälle gekennzeichnet sind. Sie sind teils für den Aufbau zelleigenen Materials verantwortlich, teils führen sie zu Energiegewinn bei gleichzeitigem Abbau. Solche Standardpotentiale sind den Systemen Zitrat und Cis-Akonitat, Iso-Zitrat und α -Ketoglutarat, α -Ketoglutarat und Succinat, Succinat und Fumarat, Fumarat und Malat sowie Malat und Oxalazetat zugeordnet (KARLSON, 1966).

Im Kohlenhydratstoffwechsel wird der glykolytische Abbau (Embden-Meyerhof-Schema), wie er beispielsweise im Muskel vor sich geht, von der Umwandlung des Pyruvats unter Aufnahme von Wasserstoff zum Laktat bestimmt, während bei der Gärung Azetaldehyd zu Äthylalkohol reduziert wird (SCHEUNERT und TRAUTMANN, 1965). Beim energetisch wichtigsten Schritt der Glykolyse wird Glycerinaldehydphosphat in Glycerinsäurephosphat umgewandelt, wobei der Wasserstoff auf ein weiteres Redoxsystem übertragen wird (HOLLMANN, 1961).

Ein anderes Redoxpaar stellt die Ascorbinsäure/Dehydroascorbinsäure dar, die im Nebenweg der Atmungskette bedeutend sind. Im Pflanzenreich wirkt die Ascorbinsäure als Redoxkatalysator stark reduzierend und geht durch Abgabe von Wasserstoff in die Dehydroascorbinsäure über. Dieser Vorgang ist reversibel. Da die Ascorbinsäure in der Nebennierenrinde vermehrt auftritt, wirkt sie wahrscheinlich als Wasserstoffdonator bei enzymatischen Hydroxylierungen in biochemischen Prozessen mit (STEPP, KÜHNAU und SCHRÖDER, 1957; KARLSON, 1966; GEBHARDT, 1964).

Wichtige Redoxsysteme im Körper sind Fermente, Co-Fermente und Substrate, die beim Abbau der Nährstoffe im Verdauungskanal, bei Ab-, Auf-

und Umbauprozessen im intermediären Stoffwechsel bis hin zu den Endprodukten Kohlendioxyd und Wasser entscheidend beteiligt sind:

Ein solches Redoxpaar stellt der Komplex Häm / Hämin dar. Der Kern des Häms, ein Eisenatom, ist zweiwertig und kann durch Oxydation in das dreiwertige Eisen-Porphyrin, das Hämin, übergeführt werden, wie dies bei der Dehydrierung tierischer und pflanzlicher Peroxydasen der Fall ist (FALK, LEMBERG und MORTON, 1961).

Zu den Häminfermenten wird auch die Gruppe der Zytochrome gerechnet. Ihre Aufgabe liegt im Elektronentransport (GRANICH und MAUZERALL, 1961). Zytocrom a, identisch mit dem Warburg'schen Atmungsferment, überträgt als letztes Glied der Atmungskette seine Elektronen auf den Atmungssauerstoff und wechselt dabei seine Valenz. Das so oxydierte Atmungsferment wird durch Zytocrom c wieder in seinen Ausgangszustand reduziert. Über Zytocrom b ist noch wenig bekannt. Es wird in Mitochondrien gefunden und ist eng mit den Flavoproteinen und Chinonen verbunden. Es ist bei der Succinatoxydation in die Atmungskette eingeschaltet und am Elektronentransport und an Hydroxylierungen beteiligt (KARLSON, 1966).

Das negativste Potential in der Atmungskette hat das Nikotinamid-adenin-dinukleotid, NAD-H und das NADP-H. Im Organismus können die reduzierten Nikotinamid-nukleotide NAD-H bzw. NADP-H als Wasserstoffsammelbecken aufgefaßt werden und greifen reduzierend unter Wasserstoffabspaltung in biochemische Prozesse innerhalb der Mitochondrien sowie im Zytoplasma ein (KARLSON, 1966).

Noch ungewiß ist die Stellung des Chinon-Hydrochinon-Systems im Ablauf der Atmungskette. Vermutet wird eine Übertragung von Wasserstoff durch Elektronenentzug auf die Zytochrome (KARLSON, 1966).

Das Redoxpotential im Pansen gesunder Wiederkäuer

Die mikrobiell-enzymatischen Verdauungsvorgänge im Vormagen der Wiederkäuer garantieren, bedingt durch die Reduktionskraft der Pansenmikroben, die Aufrechterhaltung eines starken Redoxpotentials. Für aerobe Pansenbakterien wurden optimale Stoffwechselabläufe bei Potentialdifferenzen E zwischen + 400 mV und - 200 mV, für Anaerobier zwischen + 50 mV und - 400 mV nachgewiesen. Daneben sind in geringem Maße pflanzliche Enzymsysteme an der Vormagenverdauung mitbeteiligt (HOLTENIUS, 1957).

Ergebnisse über Redoxmessungen unter Bedingungen, wie sie im Pansen gesunder Tiere vorkommen, liegen in der Literatur kaum vor. Die Potentialdifferenzen E beziehen sich dabei, soweit nicht anders vermerkt, auf Messungen mit der Kette Platin-/Kalomelektrode. So gibt MARSTON (1948) bei Zellulosevergärung *in vitro* Potentialwerte E von durchschnittlich -380 mV an, wobei Abweichungen vom Mittelwert bis zu ± 30 mV durch Fehler in den Platinelektroden verursacht werden. Der pH-Wert betrug 7. BROBERG (1957) ermittelte bei *in vitro* Messungen im Pansensaft von Schafen eine Potentialdifferenz E von ungefähr -400 mV mit einem Schwankungsbereich von ± 15 bis ± 30 mV. Er bestätigte, daß Redoxpotential und pH-Wert voneinander abhängig sind und verwandte, um Potentialdifferenzen direkt miteinander vergleichen zu können, den rH-Wert für Redoxpotentiale bei verschiedenen pH-Werten.

Seine Untersuchungen über den Verlauf der rH-Kurve teilte BROBERG (1957) wie folgt ein:

Bestimmung im unbehandelten Pansensaft, Bestimmung nach schrittweiser Ansäuerung des Vormageninhaltes und Bestimmung bei pH-Wert-Veränderung durch abrupte Ansäuerung auf verschiedene pH-Werte.

Die Messungen im unbehandelten Pansensaft teilte Broberg in 5 Gruppen ein:

1. Normalration (gemessen vor Zugabe des Kraftfutters)
2. Normalration (gemessen 20 bis 30 Minuten nach Verabreichung des Kraftfutters)
3. Übermäßige Eiweißfütterung (Normalration und Kasein)
4. Reine Strohfütterung
5. 48stündiges Hungern.

Die rH-Differenzen zwischen der Gruppe 1, 3 und 4 waren unbedeutend, während auffällige rH-Verschiebungen zwischen Gruppe 1 und 2 sowie Gruppe 1 und 5 auftraten. Das Ergebnis zeigte, daß eine grobe Abschätzung der mikrobiellen Aktivität im Pansen durch Redox-Messungen möglich ist. 20 bis 30 Minuten nach Fütterung des Kraftfutters sank der sehr stabile rH-Wert von anfänglich rH 8,3 vorübergehend auf rH 6,9 ab und war während der Hungerperiode mit rH 11,2 deutlich erhöht. Bei unterschiedlichen Futterrationen dagegen zeigte der rH-Wert mit 8,3 für Gruppe 1, 8,3 für Gruppe 3 und 8,7 für Gruppe 4 ziemliche Konstanz. Gleichzeitig konnte ein Absinken der rH-Werte bei Weidegang gegenüber Stallhaltung schon nach 2 Tagen beobachtet werden (von rH 10,2 auf rH 9,4).

Der Einfluß des pH-Wertes aufs Redoxpotential kam bei der schrittweisen Ansäuerung des Vormageninhaltes mit 2-normaler Salzsäure oder 20prozentiger Milchsäure zum Ausdruck. Die erhaltenen pH- und rH-Werte, die 10 bis 15 Minuten nach der Säurezugabe gemessen wurden, zeigten einen charakteristischen Verlauf der rH-Kurve bei gutgefütterten Tieren: bei pH-Werten von 5 und darüber bewegte sich die rH-Kurve ziemlich konstant um rH 8. Bei einem Absinken des pH unter 5 stieg der rH in einer engen pH-Spanne steil bis rH 16 an und behielt dieses Niveau auch bei weiterer Ansäuerung bei. Bei unzureichender Fütterung stieg der rH bereits bei einem höheren pH-Wert steil an. Wurde Stroh ad libitum verabreicht, so stieg bei dieser nährstoffarmen Ration der rH schon bei pH 6,5 langsamer an als bei einer Normalration und pendelte sich bei pH 5,0 auf rH 16 ein.

Bei Proben, die unter CO₂-Atmosphäre gehalten wurden, stieg die rH-Kurve erst bei einem tieferen pH-Wert an als bei den Pansensaftproben, die zum Vergleich der freien Luft ausgesetzt wurden. Durch einmaligen Zusatz variierender Säuremengen wurde der Pansensaft plötzlich auf einen tieferen pH-Wert eingestellt. Es zeigte sich nach der Ansäuerung, daß das Vermögen des Pansensaftes, ein konstantes rH-Niveau aufrechtzuerhalten, davon abhängt, ob ein vorhandener Grenzwert von ca. pH 5,0 unterschritten wird oder nicht. Bis zu einem pH von 5,0 ist der Pansensaft in der Lage, sein Redoxpotential mehr oder weniger konstant zu halten. Sinkt das pH unter 5,0 ab, so verliert der Vormageninhalt das Vermögen, sein rh-Niveau in Gegenwart von O₂ aufrechtzuerhalten, nicht dagegen in CO₂-Atmosphäre. So stiegen in Anwesenheit von Sauerstoff die rH-Werte von rH 9 bis rH 18,5 an, wobei die EMK (die elektromotorische Kraft oder die durch elektrochemische Vorgänge hervorgerufene Spannung) zunehmend positivere Werte (von E = -280 mV nach E = -90 mV) erkennen ließ. In CO₂-Atmosphäre dagegen zeigten die rH-Werte (um 11) und das Redoxpotential (E um -220 mV) über mehrere Stunden Konstanz.

Den Einfluß der Fütterung, besonders hinsichtlich der Futterart und der Futtermenge, der dabei aufgenommenen Wassermenge sowie den Einfluß der Keimzahl auf das Redoxpotential prüfte KAUFMANN (1959) anhand von 5 verschiedenen Grundfuttermitteln:

1. 10 kg Heu pro Tier/Tag
2. 8 kg Getreidemehle pro Tier/Tag
3. 60 kg Rübenblattsilage pro Tier/Tag

4. 30 kg Weidelgrassilage pro Tier/Tag

5. Weidegang.

Zuerst verglich Kaufmann die Redoxpotentiale bei Verabreichung von Rohfaser bzw. leicht verdaulichen Kohlenhydraten. Trotz der unterschiedlichen Pansenflora, bei Rohfaser mehr gram-negative Stäbchen, bei Kohlenhydraten mehr gram-positive Kokken, lagen die Redox-Potentiale E mit -374 mV bzw. -357 mV dicht beieinander. Bei Heufütterung bestand ein pH von 6,59, bei Kohlenhydrat-Fütterung von pH 6,2. Mit steigendem Rohfasergehalt war ein zunehmender Potentialabfall zu beobachten, wogegen bei überwiegend leicht verdaulichen Kohlenhydraten das Redoxpotential anstieg. Bei Weidegang wurde auf einer jungen Frühjahrsweide mit $E = -360$ mV ein vergleichbarer Wert gemessen. Nach 90 Minuten differierten die Werte etwas, wobei für Getreidemehl das gleiche Redoxpotential gemessen wurde, das man bei Weidegang festgestellt hatte. Weiter verglich Kaufmann die unterschiedliche Wirkung von Silagen auf das Redoxpotential: zum einen Rübenblattsilage mit niedrigem Rohfasergehalt und mit Mineralsäuren einsiliert, zum anderen Weidelgrassilage mit einem hohen Rohfasergehalt und ohne Zusatz. Auch bei Silage lagen die Reduktions-Oxydationspotentiale mit $E = -362$ mV für rohfaserarme Rübenblattsilage und $E = -446$ mV für eine rohfaserreiche Weidelgrassilage im Bereich der Werte bei Weidegang oder Getreidemehlfütterung. Ob die Silagen mit Salzen siliert wurden oder nicht, hatte auf das Redoxpotential keinen Einfluß. Auch bei Silagen nimmt das Redoxpotential mit steigendem Rohfaseranteil im Futter ab. Bei der Kuh mit dem höchsten Potential konnte auch die größte Futteraufnahme festgestellt werden. Die Keimzahlen dagegen waren bei der Kuh am höchsten, die das niedrigste Redoxpotential hatte. Die Wasseraufnahme war sicher ohne Bedeutung für die Höhe des Redoxpotentials.

Kaufmann betont schließlich die Heterogenität der Pansenflora hinsichtlich deren Affinität zum Sauerstoff und die Wechselwirkung aerober und anaerober Keime in Beziehung zu unterschiedlicher Nährstoffzusammensetzung. Aufbauend auf eigene Untersuchungen beschäftigte sich BROBERG (1957) mit dem Vermögen des Panseninhaltes, Sauerstoff zu verbrauchen. Er ermittelte in Pansenproben, die unter Luftzufuhr untersucht wurden, an der Oberfläche $E = -368$ mV, 2 cm unterhalb der Oberfläche $E = -433$ mV und in einer Tiefe von 8 cm $E = -443$ mV.

Wurden die Proben dagegen unter CO_2 -Atmosphäre gehalten, so lagen die

entsprechenden Redoxwerte dicht um $E = -420$ mV beieinander. Wurden die Proben also der Luft ausgesetzt, so war in der unter Luftzufuhr stehenden Oberschicht ein auffälliges Absinken des Potentials um ca. -70 mV nachzuweisen. In 2 cm Tiefe jedoch wurden wieder volle Reduktionswerte gemessen.

Wurde die oberflächliche, sauerstoffreiche Schicht mit tiefen Schichten vermischt, konnte eine kurzfristige Erhöhung des Potentials in allen Tiefen festgestellt werden. Nach wenigen Minuten waren wieder volle Reduktionswerte nachzuweisen.

Durch Einblasen von Luft in verschiedenen Mengen in den Panseninhalt in vitro, konnte das Redoxpotential vorübergehend erhöht werden, wobei das Ausmaß der Erhöhung direkt proportional zur eingeführten Luftmenge stand.

Bei Erhitzung des Pansensaftes fast bis zum Siedepunkt, verlor er die Fähigkeit, nach Einblasen von Luft sein ursprüngliches Redoxpotential aufrechtzuerhalten. Bei Insufflation von H_2O_2 in einer Konzentration von 33% in 0,5 ml, konnte eine ähnliche Redox-Potentialerhöhung wie nach Zufuhr von reiner Luft nachgewiesen werden.

Bei später durchgeführten Versuchen BROBERGS (1957) wurden 5 l Luft innerhalb von 5 Minuten in den Pansen eines Schafes ohne meßbare Redox-Verschiebung eingeblasen. Bei einer Erhöhung des Potentials von $E = -380$ mV auf $E = -140$ mV mittels H_2O_2 benötigte der Pansensaft 12 Minuten, bei einer Anhebung des Potentials auf $E = +10$ mV 75 Minuten, um das Ausgangspotential wiederherzustellen.

Durch stufenweise Ansäuerung des Panseninhaltes wurde der gleichzeitig zugeführte Sauerstoff bis zu einem pH von 5,0 kontinuierlich verbraucht, wobei der Anstieg des Redoxpotentials mit 61,5 mV für eine pH-Stufe den erwarteten Werten entsprach. Wurde der pH unter 5,0 durch Ansäuerung weiter gesenkt, blieb ein weiterer Umsatz des Sauerstoffes aus, was in einem steileren Anstieg des Redoxpotentials seinen Ausdruck fand.

BROBERG (1958) vervollständigte seine in vitro gemachten potentiometrischen Messungen an Schafen, denen er in Anlehnung an LAMPILA (1955) 2 gesäuberte Platinelektroden und eine Glas- und eine Kalomelelektrode als Bezugslektroden in den Pansen einführte, um so eine direkte Messung des Redoxpotentials vornehmen zu können. Er bestätigte durch die in vivo Messungen die als rH ausgedrückten Redoxpotentiale der in vitro durchgeführten Versuche. Broberg konnte in vivo zeigen, daß das rH-Niveau bei gesteigerter

Aktivität, z. B. nach Verabreichung einer Normalration, absank und andererseits durch Konzentratzulage bei heuärmer Fütterung anstieg. Kleinere Wassermengen beeinflussten das Potential nicht, während die Aufnahme großer Wassermengen ein Ansteigen des rH-Niveaus zur Folge hatte.

5minütiges Einblasen von 5 l Luft blieb ebenso ohne Einfluß auf den rH-Wert wie die Einführung von reinem Sauerstoff über 3 Tage. Größere Mengen Sauerstoff, über kurze Zeit insuffliert, verursachten in den nächsten Minuten ein rasches Ansteigen auf rH 19. Nach 7 Minuten begann das rH wieder abzufallen, nach 20 Minuten war der Ausgangswert wiederhergestellt. Durch Einblasen von 3prozentigem H_2O_2 stieg das rH von 8,0 auf 16 bzw. 21, war aber nach 12 Minuten von rH 16 und nach 75 Minuten von rH 21 auf rH 8 gelangt. Die Wiederkautätigkeit war dabei nicht beeinträchtigt. Die zur Erhöhung des rH-Niveaus erforderlichen Mengen waren in allen Fällen größer als diejenigen, welche unter natürlichen Verhältnissen vorkommen können, und die Wirkung ging schnell vorüber.

Wiederkauen beeinflusste das rH-Niveau auch nach langanhaltenden Wiederkauperioden nicht, obwohl größere Mengen O_2 in den Magen abgeschluckt wurden. Broberg mißt den aeroben Mikroorganismen beim O_2 -Verbrauch im Pansen große Bedeutung zu und hebt die enge Symbiose von Aerobiern und Anaerobiern im Panseninhalt hervor.

Bisherige Untersuchungen über das Verhalten des Redoxpotentials bei verschiedenen Störungen der biochemischen Vormagenverdauung

BROBERG (1957) befaßte sich mit dem Verhalten des Redoxpotentials bei verschiedenen Störungen der Vormagenverdauung. Empirisch faßte er 160 an verschiedenen Krankheiten erkrankte Tiere in 4 Gruppen zusammen und ermittelte das Redoxpotential in deren Pansensaft, den er teils unbehandelt untersuchte und teils vorher stufenweise ansäuerte:

1. Tiere mit normalem Appetit
2. Tiere mit herabgesetztem Appetit
3. Tiere mit akutem Überfressen an Getreide (Pansenazidose)
4. Tiere mit Tympanie.

Bei Tieren mit normalem Appetit zeigten, wie erwartet, die Redoxpotentiale keine Abweichungen vom Normalpotential gesunder Tiere, weder bei un-

behandeltem noch bei vorher angesäuertem Pansensaft. Auch bei Fäulnis konnte BROBERG (1956) keine Unterschiede feststellen.

Bei Tieren mit herabgesetztem Appetit zeigten die Redoxpotentiale im unbehandelten Panseninhalt normale rH-Werte. Bei stufenweiser Ansäuerung jedoch stieg die rH-Kurve bereits bei einem höheren pH-Wert als normal an, so wie es Broberg in früheren Versuchen in vitro bei Tieren mit verminderter Fütterung nachgewiesen hat. Die Verbesserung der Fütterung und die Wiederherstellung des normalen Appetits führte zu einer sofortigen Verschiebung des rH-Knicks nach rechts und nach unten, wobei die rH-Kurve erst bei niedrigeren pH-Werten zu steigen beginnt. In wenigen Fällen traten erhebliche Abweichungen vom rH schon im unbehandelten Pansensaft auf. Hierbei zeigten die Tiere vollständige Appetitlosigkeit mit gleichzeitig erhöhten pH-Werten durch Verminderung der Produktion flüchtiger Fettsäuren bei gleichzeitig fortgesetzter Sekretion von Speichelkarbonaten. Ebenso war der rH-Wert erhöht. Da Broberg die Aufrechterhaltung des Redoxpotentials allein der Aktivität der Bakterienflora zuschreibt, ist seiner Meinung nach das Ansteigen des rH-Niveaus auf die durch Ausbleiben neuer Nahrungsquellen immer ungünstiger werdenden Umweltbedingungen für die Bakterienflora zu suchen, die dadurch nicht mehr in der Lage ist, ein konstantes rH-Niveau aufrechtzuerhalten. Demgegenüber führen BALDWIN und EMERY (1960) die Aufrechterhaltung des Redoxpotentials nur zu 9% auf die Bakterienflora zurück. Die Ausgangswerte des Pansensaftes vor der Ansäuerung zeigten bereits rH-Werte von 17,5 und 14,5, die auf eine bakterielle Inaktivität mit dem Vorhandensein vom Normalen abweichender Redox-Systeme zurückzuführen sind. Die Werte lagen schon so hoch, daß der kritische Punkt, an dem die rH-Kurve zu steigen beginnt, nicht mehr darzustellen war.

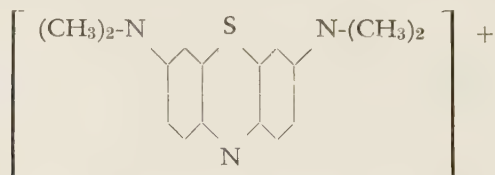
Aufgrund des nach der Fütterung einsetzenden Kohlenhydratabbaus steigt die Konzentration der organischen Säuren an, während der pH-Wert abfällt. Übersteigt das Angebot an leicht verdaulichen Kohlenhydraten die Norm, so ist die Säureproduktion so hoch, daß pH-Werte außerhalb des physiologischen Bereiches die Folge sind. HUNGATE, DOUGHERTY, BRYANT und CELLO (1952) haben bei der Pansenazidose Werte zwischen pH 4,7 und 4,2 beobachtet können, BROBERG (1957) ermittelte pH-Werte zwischen pH 5,1 und 4,0. Bis zu einem pH von ca. 5,0 kann der rH-Wert, bei Brobergs Messungen rH 8,8 bei pH 5,3, aufrechterhalten werden. Dann jedoch steigt die Kurve steil bis auf Werte um rH 17,5 an, was einem Ansteigen der EMK bis etwa $E = + 20 \text{ mV}$ gleichkommt.

In der vierten Gruppe wurde bei Tieren mit Tympanie das Redoxpotential bestimmt. Das ohnehin geringe Tiermaterial brachte sowohl deutlich erhöhte (bis rH 17,2) als auch normale rH-Werte (um rH 8,3). In einem Fall war der rH abnorm niedrig (rH 2,8), weshalb Broberg eine uneinheitliche Ätiologie der Tympanitis acuta vermutet hat.

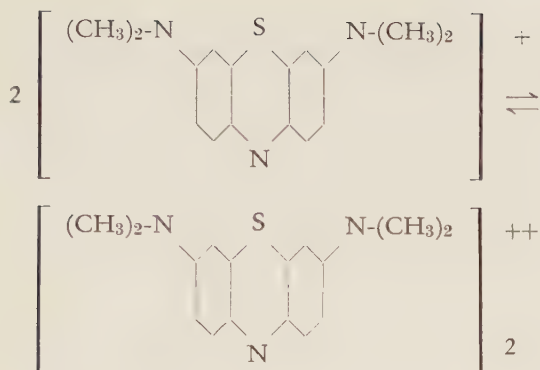
Das Wesen der Methylenblaureduktion

Die Entfärbung des Methylenblaus beruht auf einer Reduzierung des Farbstoffes durch Wasserstoffanlagerung. Dabei geht Methylenblau in seine Leukoform über. Die Geschwindigkeit, mit der diese Reaktion abläuft, ist gleichzeitig ein Gradmesser für die Reduktionskraft des Substrates, in das Methylenblau verbraucht wird (SANTOMAURO, ARRAGUNDE und BARRIOLA, 1968). BROBERG (1957) betont jedoch in diesem Zusammenhang, daß auch der pH-Wert die Höhe des Redoxpotentials beeinflusst. SCHÖNHERR (1967) bestätigt, daß das Reduktionsvermögen, z. B. in der Milch, bei steigenden pH-Werten zunimmt.

Methylenblau, methylenum caeruleum (DAB 7), in der Medizin bei Vergiftungen mit Kohlenmonoxyd oder Zyanverbindungen und als Antiseptikum bei Malaria verwandt (RÖMPP, 1950), ist ein organischer Farbstoff aus der Phenothiazinreihe (GEBHARDT, 1964) und liegt im Bereich von pH 2,0 bis pH 12,0 als einwertiges Kation vor. Dabei ist das Kation selbst Träger der positiven Ladung und nicht ein einzelnes Atom. Man spricht von einer sogenannten Ladungsresonanz des Methylenblaus (LEMBKE, KAUFMANN und LAGONI, 1952):



Da die Assoziationskräfte des Methylenblaus besonders stark sind, liegt es nur in sehr wäßrigem Milieu in dieser Kation-Form vor. Bei höher konzentrierten Lösungen vereinigen sich die Kationen paarweise zu einem Doppelpion, wobei es zur Ausbildung eines Gleichgewichtes kommt. Dieser Vorgang ist reversibel:



Der Mechanismus der physikalisch-chemischen Reduktion des Methylenblaus ist bis heute nicht vollständig geklärt. In der Milch wird Methylenblau durch starke zwischenmolekulare Anziehungskräfte an das Apo-Ferment einer Zelle gebunden. Dabei verdrängt es die Brenztraubensäure, die zu Milchsäure reduziert wird. Die am Co-Ferment der Zelle freiwerdenden H-Atome lagern sich jetzt ans Methylenblau an und reduzieren es in seine Leukoform (LEMBKE, KAUFMANN und LAGONI, 1952).

Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, daß durch Zusatz starker geladener Gruppen, wie sie z. B. die Aminosäuren darstellen, diese das Methylenblau vom Apo-Ferment abspalten, wodurch es zur Verlängerung der Abbauzeiten kommt (LAGONI, 1951). JENSEN (1937) wies nach, daß auch Stoffwechselprodukte der Bakterien, wie z. B. Milchsäure, die Methylenblau-reduktion hemmen können. MÜLLER (1906) und SCHMIDT (1906) verkürzten die Reduktionszeit durch Einbringen von Bakterienstämmen in die Milch, und indem sie den Säuregrad der Milch steigerten. ROEDER (1954) sieht in der Reduktionszeit nur einen Ausdruck für die Aktivität der Bakterien und nur eine schwache Beziehung zur Keimzahl. KLIMMER und SCHÖNBERG (1951) weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, daß die Bakterien in 3 Gruppen einzuteilen seien: schnelle, mittelschnelle und langsame Reduktasebildner. Daneben sei die Reduktionsdauer stark abhängig von zelligen Elementen, besonders den Leukozyten. BROGMUS (1950) gibt in seiner Dissertation genaue Daten über die Beeinflussung der Reduktaseprobe durch besondere Bakterienarten und bestätigt deren unterschiedliche Reduktasebildung. Eine Beschleunigung der Reduktaseprobe konnte EHRSTRÖM (1920) durch Zusatz von

Nährbouillon nachweisen, LEMBKE, KAUFMANN und LAGONI (1952) durch Zusatz freier und freigelegter SH-Gruppen.

Im Spermienstoffwechsel wird bei der Aufspaltung des Fruktosephosphats in Glyzerinaldehydphosphat und Dihydroxyazetonphosphat molekularer Wasserstoff frei, der sich an das Koenzym DPN (Dipyridin-Nukleotid) anlagert. Wird Methylenblau dazugegeben, so geht das Wasserstoffmolekül auf das Methylenblau über und reduziert dieses dabei in einen Leukoabkömmling (SANTOMAURO, ARRAGUNDE und BARRIOLA, 1968).

Bisherige Anwendung von Redox-Farbstoffen im biologischen Test

Die Verwendung von Redox-Farbstoffen im biologischen Test ist in der Tiermedizin schon seit langem bekannt. NEISSER und WECHSBERG (1906) führten die Methylenblauprobe als sogenannte „Reduktase-Probe“ in die Milchuntersuchung ein, um sich auf diese Weise ein Bild über den Frischzustand der Milch zu verschaffen. RULLMANN und TROMMSDORF (1906) bestätigten die Reduktase-Probe und schlossen die Möglichkeit einer indirekten Keimzahlbestimmung in die von ihnen gefundenen Versuchsergebnisse ein. SCHMIDT und MÜLLER (1906) berichteten zum erstenmal von einer Verkürzung der Reduktionszeit bei steigendem Bakteriengehalt und Säuregrad und stellten damit die Beeinflussung der Reduktionszeit durch Hinzufügen bestimmter Stoffe fest. KLIMMER und SCHÖNBERG (1951) empfahlen zur Reduktionsprüfung in der Milch nur die Methylenblausorten „Methylenblau medicinale“ und „Methylenblau B extra“ der Firma Merck.

CHRISTIANSEN (1926) führte das „Janusgrün B“, eine Anilinverbindung (Diaethylsafranin-acidomethylanilin), in die Milchuntersuchung ein. Janusgrün B, im sauren Milieu blaugrün, im alkalischen grasgrün, schlägt in der ersten Reduktionsphase von violett nach hellrot in O₂-beständiges Safranin um und wird in der zweiten Reduktionsstufe farblos, wobei die Verbindung gegen Sauerstoff instabil wird. Die Beurteilung der Probe erfolgt deshalb in der ersten Stufe.

KLIMMER und SCHÖNBERG (1951) halten das Resazurin für die Beurteilung der Milchqualität am geeignetsten, da die von ihnen gefundenen Reduktionszeiten mit dem Ergebnis der gleichzeitig durchgeführten direkten Keimzahlbestimmung am besten übereinstimmen. Resazurin, ein blau-violetter, kri-

stalliner Farbstoff, geht durch O_2 -Verlust in Oxazin und spontan weiter in rosarotes Resorufin über. In der zweiten Reduktionsphase, die langsam abläuft, entsteht das reversible, farblose Dihydroresufin. Die Beurteilung der Probe erfolgt deshalb in der zweiten Stufe. WATSON (1948) bevorzugte die Resazurinprobe deshalb, weil er eine erhöhte Empfindlichkeit dieses Farbstoffes gegenüber zelligen Elementen, besonders Leukozyten, festgestellt hatte.

ZINN (1938) führte seine Milchqualitätsuntersuchung mit Azurufin, einem Oxazinfarbstoff und damit einem engen Verwandten des Resazurins, durch und hebt die Indikatoreigenschaften beider Farbstoffe hervor: blau nach rot im pH-Bereich 6,5 bis 5,3 und rot über gelb (Zwischenstufe beim Azurufin) nach farblos im pH-Bereich von 5,3 bis 4,8.

SCHÖNBERG (1956) berichtet von gelegentlichen Reduktaseproben mit Neutralrot, mit verdünnter Safraninlösung (1:20 000) und mit einer 1prozentigen Lackmuslösung.

KÜHN und JERCHEL (1941) führten die Tetrazoliumsalze in die Milchuntersuchung ein. Dabei eignete sich das Tetrazoliumchlorid am besten. Tetrazoliumchlorid ist farblos und geht durch Reduktion in rotes Formazan über.

SCHÖNBERG (1951) wandelte die Versuchsanordnung dahin ab, daß er einen Verwandten des Tetrazoliumchlorids, das farblose Triphenyl-Tetrazoliumchlorid (TTC), in 0,1prozentiger Lösung verwandte. 2 ml der farblosen Flüssigkeit wurden mit 10 ccm Milch vermischt. Die Reaktion ist beendet, wenn sich rotes Formazan gebildet hat. Dieses färbt die Bakterien rot und fällt selbst in dicken Flocken aus. SCHÖNHERR (1957) konnte mit einer TTC-Lösung am besten das Ergebnis der direkten Keimzahlbestimmung bestätigen und erzielte bei parallellaufenden Versuchen mit Resazurin und Methylenblau bei Verwendung von TTC die geringsten Abweichungen vom Mittelwert der gefundenen Reduktionszeiten.

Heute werden, in den einzelnen Ländern unterschiedlich, bei der Qualitäts- und Frischebestimmung der Milch die Reduktaseproben mit Methylenblau, Resazurin oder Tetrazoliumsalzen durchgeführt.

Wenig Literatur findet sich über die Anwendung von Redox-Farbstoffen in der Spermatologie. MILANOV (zit. nach DURAN DEL CAMPO und DE BONI, 1962) führt den sogenannten „Methylenblautest“ als Indikator für die Aktivität und Vitalität der Spermienzellen durch, wobei die Entfärbedauer Ausdruck einer mehr oder weniger großen metabolischen Aktivität der Spermatozoen ist. Gleichzeitig hängt die Reduktionsdauer noch von der Menge der

anwesenden Spermatozoen und vom Vorhandensein anderer lebender Elemente, wie Zellen und Bakterien, ab. SANTOMAURO, ARRAGUNDE und BARRIOLA (1968) folgern aus den Stoffwechselvorgängen der Bakterien, daß die Menge produzierten H_2 als Folge der metabolischen Wirksamkeit um so größer ist, je kürzer die Zeit der Methylenblaufärbung ist. Das heißt, eine geringere Reduktionszeit des Methylenblaus ist der Ausdruck eines besseren und aktiveren Metabolismus und mithin einer größeren Spermavitalität.

Die vorliegenden Arbeiten über die Verwendung von Redoxfarbstoffen in der Pansensaftdiagnostik beschäftigen sich mit der Spezifizierung bestimmter Gruppen von Pansenbakterien und nicht mit der Erfassung der Gesamtaktivität der Pansenflora. Die Autoren nützen dabei das verschiedenartige Wachstumsverhalten der Bakterien bei entsprechenden pH-/rH-Werten, d. h. bei einem bestimmten Redoxpotential, aus. So isolierte HUNGATE (1950) anaerobe, mesophile, zellulolytische Bakterien (sporenbildende und nicht sporenbildende Stäbchen sowie farblose wie gelbe Kokken) aus einer Pansensaft-Zellulose-Agar-Kultur. Diese enthielt neben einer organischen Salzlösung und einer Zellulosesuspension reines CO_2 und 0,5prozentiges Natriumbicarbonat als Puffer (pH-Wert um 7,0), 0,02prozentiges Natriumglykolat, Zystein 0,01prozentig und Natriumsulfid als reduzierende Stoffe und eine 0,0001prozentige Resazurininlösung als Redox-Indikator. Ein solcher Agar, der speziell anaeroben, mesophilen, zellulolytischen Keimen als Nahrung dient, wurde von Hungate mit frisch entnommenem Pansensaft beimpft. Resazurin als Indikator schlägt dabei bei einem elektrometrisch ermittelten Potential von $E_o' = -42$ mV von rosa nach farblos um.

Seine Untersuchungen setzte HUNGATE zusammen mit SMITH (1958) mit der Isolierung des *Methanobacterium ruminantium* fort, wobei er dem von ihm in früheren Versuchen verwandten Nährboden ein Gemisch aus 80 % Wasserstoff und 20 % Kohlendioxyd beimischte. Aus diesem Wasserstoff-Kohlendioxyd-Gemisch wurde in Anwesenheit von *Methanobacterium ruminantium* Methan gebildet. Da Hungate und Mitarbeiter früher (1954) festgestellt hatten, daß für ein Wachstum des *Methanobacterium* ein tiefes Redoxpotential notwendig ist (im entsprechenden Pansensaft wurden Potentialwerte zwischen -335 und -346 mV gemessen), verwandten sie den Redoxindikator Benzylviologen mit $E_o' = -359$ mV.

KISTNER (1960) führte seine Versuche an Schafen durch und befaßte sich mit der Diagnostik und Isolierung kohlenhydratabbauender Bakterien. Durch Beimengung der reduzierenden Substanzen Zysteinhydrochlorid und Na-

triumdithionitlösung (0,003prozentig) konnte das Redoxpotential während der Herstellung der Medien auf $E = -400$ bis -440 mV gehalten werden. Als Indikator hat sich Resazurin nicht geeignet, das erst dann reduziert wurde, wenn die reduzierenden Substanzen bereits oxydiert waren. Dagegen bewährte sich Indigodisulfonat, welches bei einem $E_o' = -125$ mV von blau nach gelblich übergeht. Kistner übernahm dabei die von BRYANT (1959) empfohlene Konzentration (0,0005prozentige Lösung) wegen des deutlichen Farbumschlages und wegen der Unschädlichkeit gegenüber Nährboden und Pansensaft.

Die Isolierung proteolytischer Bakterien aus dem Schafpansen auf flüssigen und festen Nährboden versuchten HOBSON und BLACKBURN (1962). Bei einleitenden Versuchen mit Zystein als reduzierendem Agens und Resazurin als Redoxindikator, konnte das erforderliche tiefe Redoxpotential nicht eingestellt werden. Durch Verwendung des Redoxsystems Zystein und Dithionit wurde das Redoxpotential auf $E = -410$ bis -470 mV herabgesetzt, so daß Phenosafranin, das bei $E_o' = -252$ mV von rot nach farblos umschlägt, in einer Konzentration von 0,0001 g verwendet werden konnte.

Eigene Untersuchungen

Versuchstiere

Als Versuchstiere standen zwei mit einer Pansenfistel versehene Kühe, eine etwa 8jährige graubraune Höhenviehkuh (550 kg KGW) und eine etwa 5jährige Deutsche Schwarzbunte (500 kg KGW) zur Verfügung. Die graubraune Höhenviehkuh war tragend und wurde zu Beginn der Versuche trockengestellt; sie kalbte nach Versuchsende ab. Das zweite Versuchstier war nichttragend. Beide Kühe wurden täglich auf ihren Allgemeinzustand kontrolliert.

Untersuchungstechnik

Pansensaftentnahme, -untersuchung und -beurteilung

Die Entnahme des Pansensaftes erfolgte über die Pansenfistel. Als Sonde diente ein selbstgefertigtes, etwa 60 cm langes und 7 mm weites Metallrohr, bei dem an einem Ende 8 fünf Millimeter weite Sauglöcher eingebohrt wurden, die gleichzeitig die Funktion eines Siebes übernehmen sollten. Am gegenüberliegenden Ende des Metallrohres wurde eine 200 ccm fassende „Janet-Spritze“ über einen Plastikverbindungsschlauch mit dem Metallrohr verbunden und der so abgesaugte Pansensaft in Flaschen von 500 ccm Fassungsvermögen aufgefangen. Besonderes Augenmerk wurde darauf gerichtet, die Sonde bei jeder neuerlichen Entnahme in gleichem Winkel und in gleiche Tiefe einzuführen, um die Proben möglichst immer aus dem gleichen Bezirk des Pansens zu gewinnen.

Die Beurteilung der abgesaugten Pansensaftproben erfolgte nach den von HOLTENIUS, BJÖRCK und HOFLUND (1959) angegebenen Richtlinien unmittelbar nach der Entnahme, um mikroskopische und makroskopische Veränderungen, wie sie von DIRKSEN und WOLF (1963) bzw. HOFLUND und KARLSON (1963) beschrieben werden, auszuschließen.

Der pH-Wert wurde mit dem „Spezial-Indikatorpapier“ Merck, Bereich pH 5,4–pH 7,0, bestimmt.

Die Farbe wurde nach kräftigem Durchmischen des Pansensaftes in der Mittelschicht der Entnahmeflasche beurteilt und nach folgendem Schema differenziert: hellgrün, grün, grünbraun, grüngrau, milchiggrau, hellbraungrün, braungrün, mittelbraun und dunkelbraun.

Der Geruch des Vormageninhaltes wurde als aromatisch, schwach aromatisch, geruchlos, indifferent, fade, stechend und sauerstechend angegeben.

Die Konsistenz des Pansensaftes wurde als viskös, leicht viskös, mehr flüssig, wässrig und stark wässrig bezeichnet.

Sedimentation und Flotation wurden 10 Minuten nach dem Absaugen beurteilt: Abweichungen der Sedimentationsgeschwindigkeit wurden mit beschleunigt, rasch und sehr rasch bezeichnet, Abweichungen der Flotationsgeschwindigkeit mit relativ schnell bzw. verzögert und ausbleibend.

Die Menge der Protozoen wurde unter dem Mikroskop bei 40facher Vergrößerung geschätzt:

- — — keine oder nur vereinzelte lebende Infusorien
- + — — geringe Mengen meist kleiner Infusorien
- + + — zahlreiche Infusorien verschiedener Größe
- + + + massenhaft Infusorien verschiedener Größe

Die Glukosegärprobe (nach HOLTENIUS, BJÖRCK und HOFLUND, 1959), die Zellulosedigestionsprobe (nach HOFLUND, QUIN und CLARK, 1948), die Nitritreduktionsprobe (nach HOLTENIUS, 1957) sowie die mikroskopische Untersuchung des Bakteriengehaltes wurden nur sporadisch durchgeführt.

Durchführung der Methylenblauprobe

Die Methylenblauprobe wurde nach Abschluß der Vorversuche in folgender Weise ausgeführt:

1 ml einer 0,03prozentigen wässrigen Methylenblaulösung (entsprechend 0,3 mg Methylenblau DAB 7 pro ml aqua dest.) wird mittels Tropfflasche oder Pipette in ein gewöhnliches Reagenzglas verbracht, das 20 ml faßt. Ein zweites Reagenzröhrchen wird für die Vergleichsprobe bereitgestellt. Beide Gläser werden nun mit frischentnommenem, gut durchmischem Pansensaft bis etwa fingerbreit unter den Rand aufgefüllt. Durch mehrmaliges Stürzen der mit dem Daumen oder einem Stopfen verschlossenen Reagenzröhrchen

vermischt man die Methylenblaulösung mit dem Pansensaft. Zugleich wird die Zeit genommen, wofür eine gebräuchliche Armbanduhr mit Sekundenzeiger genügt, und anschließend darauf geachtet, binnen welcher Zeitspanne der blaugefärbte Pansensaft die Farbe des zum Vergleich daneben gehaltenen Kontrollröhrchens wieder angenommen hat. Die Reduktion ist als beendet anzusehen, sobald die blaue Färbung in der breiten Mittelzone der Flüssigkeit im wesentlichen, das heißt, bis auf einen meist noch zurückbleibenden schwachen dunklen Schimmer verschwunden ist, und sich eine deutliche Grenze zu der je nach Reduktionskraft unterschiedlich breiten blauen Oberschicht gebildet hat. Das Sediment erscheint gewöhnlich etwas dunkler als der Bodensatz der Vergleichsprobe, auch erfolgt die Sedimentation im Teströhrchen offenbar meist langsamer als im anderen Glas. Die Umgebungstemperatur sollte während der Durchführung des Tests nicht unter Zimmertemperatur von $+ 20^{\circ}$ bis $+ 22^{\circ}$ C liegen.

Läßt man die Proben nach erfolgter Reduktion unverschlossen stehen, so kehrt nach etwa 6 Stunden die blaue Färbung in der breiten Mittelzone des Reagenzglases durch Reoxydation eines Teiles des gebildeten Leukomethylenblaus durch den Luftsauerstoff wieder.

Versuchsanordnung

In Vorversuchen sollte zunächst durch Variation der benützten Pansensaft- und Methylenblaumengen der Test so eingestellt werden, daß er verhältnismäßig schnell und einfach, auch unter den Bedingungen der tierärztlichen Landpraxis ausführbar ist. Einzelheiten werden in den entsprechenden Kapiteln genannt.

Weitere Vorversuche, bei denen der entnommene Vormageninhalt durch Keimtötung und Ansäuerung vorbehandelt wurde, sollten den Einblick in das Wesen des Reduktionsmechanismus erweitern.

In den Hauptversuchen wurden die Pansenfistelkühe zunächst auf eine gemischte, ausbalancierte Ration (Einzelheiten in den entsprechenden Kapiteln) eingestellt, die erfahrungsgemäß zu einer ausgeglichenen intensiven Fermentation mit hohen Keimzahlen und reichhaltig zusammengesetzter Flora und Fauna führt.

Sodann wurde ausschließlich Heu mäßiger Qualität ad libitum angeboten. Bei dieser einseitigen, zellulosereichen Fütterung bleibt zwar die komplexe Vormagenflora mit relativ gleichmäßiger Aktivität der Pansenbakterien vor-

wiegend erhalten, jedoch sinken die Keimzahlen erheblich, was zu einem langsameren Futterabbau führt (ORTH und KAUFMANN, 1961).

Zum Zwecke der Inaktivierung der Pansenflora wurde den Versuchskühen anschließend Stroh zur freien Aufnahme gereicht. Hierbei tritt eine Verminderung an leicht verdaulichen Nährstoffen auf, die zu einer deutlichen Abnahme der Bakterienzahl führt und die biochemischen Verdauungsprozesse stark reduziert.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, die Vormagenflora schrittweise mit einem Antibiotikum zu inaktivieren. Hierfür eignet sich besonders Aureomycin (HOFLUND, 1959), das die bakterielle Tätigkeit durch Keimhemmung und -abtötung, besonders der zellulolytischen Mikrobenarten (HOFLUND, 1959) einschränkt und zum Erliegen jeglicher mikrobieller Verdauungstätigkeit führt.

Zum Abschluß sollte die Methylenblauprobe unter pathologischen Bedingungen an Hand der experimentell erzeugten Pansenazidose geprüft werden. Hierbei kommt es zu einer Verschiebung der normalen gram-negativen Keimflora hin zu einer vorwiegend gram-positiven Stäbchen- und Kokkenflora, zu einem Absterben der Infusorien, zu einer hohen Milchsäurekonzentration und Verflüssigung des Vormageninhaltes (DIRKSEN, 1966, u. a.). Gleichzeitig wurde die Auswirkung einer pH-Korrektur auf das Reduktionsvermögen des Pansenstoffes untersucht.

Vorversuche mit wechselnden Methylenblaumengen zur Einstellung der Methylenblauprobe als „Schnelltest“

Die erste Versuchsreihe diente dazu, die Methylenblauprobe durch wechselnde Methylenblaukonzentration zur Verwendung als „Schnelltest“ abzustimmen. Zu diesem Zweck wurde mit 0,01prozentiger, 0,02prozentiger, 0,03prozentiger und 0,05prozentiger Methylenblaulösung experimentiert. Die Pansenstoffmenge war durch die Verwendung der gebräuchlichen, 20 ml fassenden Reagenzgläser gegeben.

Wurde 1 ml einer 0,01prozentigen Methylenblaulösung mit 20 ml Pansenstoff versetzt, konnte nur selten das Ende des Entfärbeprozesses exakt bestimmt werden, weil schon zu Beginn der Reduktion keine intensive Blaufärbung ausgemacht werden konnte und daher der Übergang von „blau“ zu „farblos“ keine klaren Farbunterschiede zeigte.

Aus denselben Gründen war es auch bei Erhöhung der Konzentration auf 0,2 mg Methylenblau pro ml aqua dest. in manchen Fällen nicht möglich, das Reaktionsende festzulegen.

Bei Verwendung von 1 ml einer 0,05prozentigen Methylenblaulösung lagen die Abbauzeiten bei aktivem Pansensaft zwischen 10 und 15 Minuten. Diese Werte lassen schon bei geringgradigen Aktivitätsminderungen Reduktionszeiten über 30 Minuten erwarten; derart lange Entfärbezeiten erscheinen für einen „Schnelltest“ ungeeignet.

Geeignet erwies sich die Verwendung von 1 ml einer 0,03prozentigen Methylenblaulösung, entsprechend 0,3 mg Methylenblau (DAB 7) pro ml aqua dest. Bei einer derartigen Konzentration war es zum einen möglich, den Übergang von „blau“ zu „farblos“ und damit das Ende der Methylenblau-entfärbung genau zu bestimmen, zum anderen erschienen die erhaltenen Reduktionszeiten den Anforderungen eines Schnelltestes zu genügen.

In der Folge wurden die Verlaufsuntersuchungen aufgrund der gesammelten Erfahrungen ausschließlich mit einer 0,03prozentigen, wäßrigen Methylenblaulösung durchgeführt.

Vorversuche an inaktiviertem Panseninhalt

Um die Vormagenflora abzutöten, wurden Pansensaftproben von gesunden Tieren, von Tieren mit herabgesetzter biochemischer Verdauungsaktivität und von Tieren mit pathologischen Pansensaftbefunden abgesaugt und bis zum Kochen erhitzt. In allen Fällen blieb bei Zugabe von Methylenblau eine Entfärbung aus. Dabei wurde Methylenblau sowohl kalt wie warm gelöst zugefügt.

Wurden die Vormagenkeime in Pansensaftproben von gesunden Tieren, von Tieren mit herabgesetzter Verdauungsintensität und von Tieren mit pathologischen Pansensaftbefunden mit einigen Tropfen einer 10prozentigen kalten oder warmen Formalinlösung fixiert und Methylenblaulösung hinzugefügt, fand keine Entfärbung des Methylenblaus statt.

Verlauf der Methylenblaureduktion bei unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen des abgesaugten Pansensaftes sowie im zeitlichen Abstand von der Pansensaftentnahme

Von den beiden Versuchskühen, der Grauviehkuh und der Schwarzbunten, deren Pansensaft volle Reduktionskraft besaß, wurden etwa 2 Stunden nach der Morgenfütterung per Fistel Pansensaftproben entnommen. Eine Hälfte des entnommenen Pansensaftes wurde jeweils bei Zimmertemperatur aufbewahrt, die andere Hälfte bei 39° C im Brutschrank gehalten. Mit Teilen von beiden Partien wurde sofort, sowie nach 2, 3, 4, 6 und 9 Stunden die Methylenblauprobe durchgeführt. Ein Teil des bei Zimmertemperatur aufbewahrten Pansensaftes wurde zuvor auf 39° C erwärmt. Der gleiche Versuch wurde mit einer 3 Tage später von der Grauviehkuh entnommenen Pansensaftprobe (Probe 3) wiederholt.

Wie aus Tabelle 1 und Diagramm 1 hervorgeht, ergaben sich bei der Durchführung der Methylenblauprobe mit den bei Zimmertemperatur aufbewahrten Pansensaftproben folgende Reduktionszeiten:

Probe 1 (Grauvieh): Die sofort nach der Pansensaftentnahme 65 Sekunden betragende Reduktionszeit verlängerte sich nach 2 Stunden auf 230 Sekunden, nach 3 Stunden auf 385 Sekunden, nach 4 Stunden auf über 30 Minuten und nach 6 Stunden auf über 60 Minuten.

Probe 2 (Schwarzbunte): Die Pansensaftprobe, die bei Entnahme Methylenblau in 73 Sekunden reduzierte, entfärbte die Methylenblaulösung nach 2 Stunden in 260 Sekunden, nach 3 Stunden in 490 Sekunden, nach 4 Stunden in über 30 Minuten und nach 6 Stunden in über 60 Minuten.

Probe 3 (Grauvieh): Unmittelbar nach der Entnahme reduzierte die Pansensaftprobe die Methylenblaulösung in 69 Sekunden. Die Entfärbezeit verzögerte sich nach 2 Stunden auf 250 Sekunden, nach 3 Stunden auf 390 Sekunden, nach 4 Stunden auf über 30 Minuten und nach 6 Stunden auf über 60 Minuten.

Wurde der Pansensaft bei 39° C im Brutschrank gehalten und erst unmittelbar vor jeder Methylenblauprobe entnommen, ergaben sich folgende Reduktionszeiten:

Probe 1 (Grauvieh): Die sofort nach der Pansensaftentnahme 65 Sekunden betragende Reduktionszeit verlängerte sich nach 2 Stunden auf 98 Sekunden, nach 3 Stunden auf 99 Sekunden, nach 4 Stunden auf 97 Sekunden, nach 6 Stunden auf 208 Sekunden und nach 9 Stunden auf über 30 Minuten.

Probe 2 (Schwarzbunte): Die Pansensaftprobe, die bei Entnahme Methylenblau in 73 Sekunden reduzierte, entfärbte die Methylenblaulösung nach 2 Stunden in 96 Sekunden, nach 3 Stunden in 115 Sekunden, nach 4 Stunden in 139 Sekunden, nach 6 Stunden in 230 Sekunden und nach 9 Stunden in über 30 Minuten.

Probe 3 (Grauvieh): Unmittelbar nach der Entnahme reduzierte die Pansenprobe die Methylenblaulösung in 69 Sekunden. Die Entfärbezeit verzögerte sich nach 2 Stunden auf 102 Sekunden, nach 3 Stunden auf 120 Sekunden, nach 4 Stunden auf 130 Sekunden, nach 6 Stunden auf 254 Sekunden und nach 9 Stunden auf über 30 Minuten.

Bei den Proben, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt und jeweils vor der Methylenblauprobe auf 39°C erwärmt wurden, wurden die folgenden Reduktionszeiten ermittelt:

Probe 1 (Grauvieh): Die sofort nach der Pansensaftentnahme 65 Sekunden betragende Reduktionszeit verlängerte sich nach 2 Stunden auf 71 Sekunden, nach 3 Stunden auf 77 Sekunden, nach 4 Stunden auf 79 Sekunden, nach 6 Stunden auf 107 Sekunden und nach 9 Stunden auf 152 Sekunden.

Probe 2 (Schwarzbunte): Die Pansensaftprobe, die bei Entnahme Methylenblau in 73 Sekunden reduzierte, entfärbte die Methylenblaulösung nach 2 Stunden in 75 Sekunden, nach 3 Stunden in 87 Sekunden, nach 4 Stunden in 82 Sekunden, nach 6 Stunden in 88 Sekunden und nach 9 Stunden in 143 Sekunden.

Probe 3 (Grauvieh): Unmittelbar nach der Entnahme reduzierte die Pansenprobe die Methylenblaulösung in 69 Sekunden. Die Entfärbezeit verzögerte sich nach 2 Stunden auf 81 Sekunden, nach 3 Stunden auf 93 Sekunden, nach 4 Stunden auf 111 Sekunden, nach 6 Stunden auf 129 Sekunden und nach 9 Stunden auf 174 Sekunden.

Verlaufsuntersuchung bei Verfütterung einer gemischten Ration

Im folgenden Versuch wurde den beiden Pansenfistelkühen eine ausbalancierte Heu-Kraftfütterration verfüttert, bei der erfahrungsgemäß mit einer hohen biochemischen Verdauungsaktivität zu rechnen ist, um Bezugs-(Normal-)Werte für die Beurteilung der Methylenblauprobe zu ermitteln. Gleichzeitig wurden die Proben in 2stündigem Abstand von der Fütterung vorgenommen, um die Abhängigkeit der Probe von der Futterzeit festzustellen.

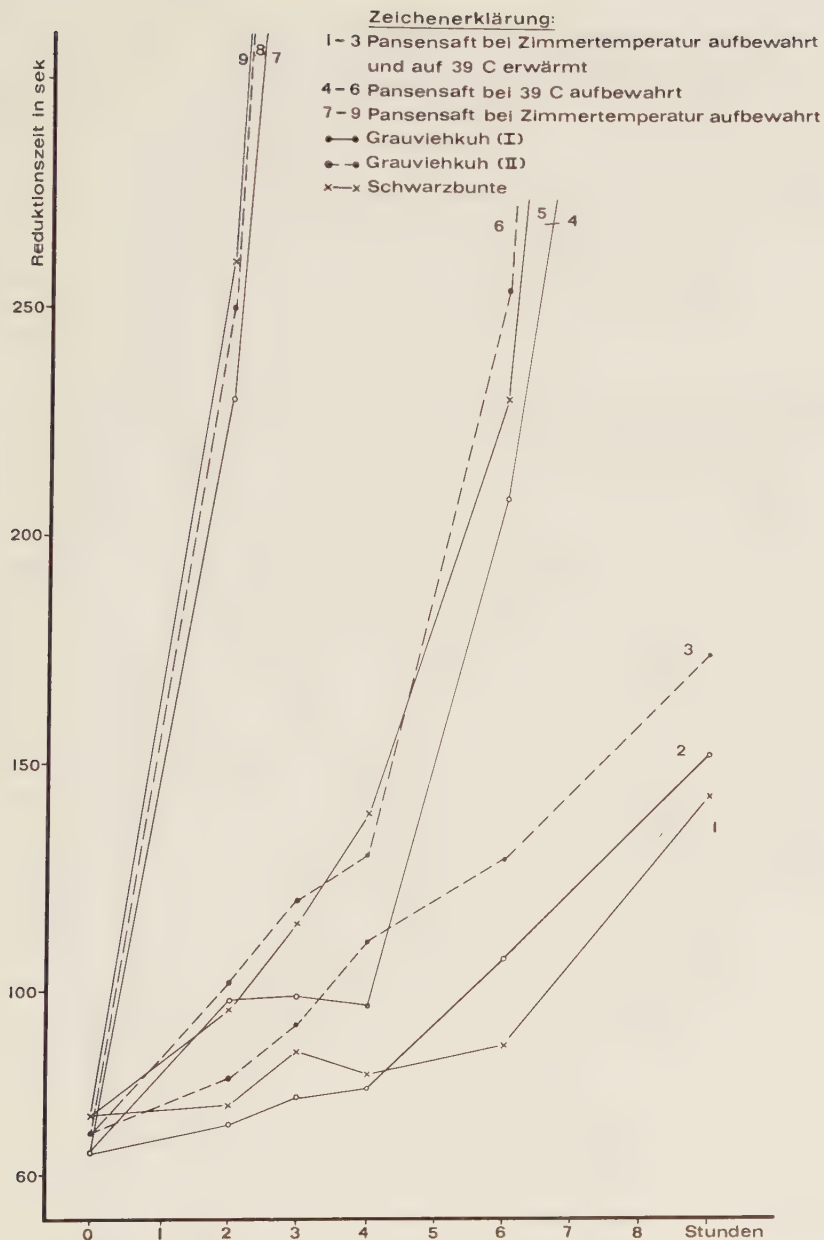


Diagramm 1: Ausfall der Methylenblauprobe bei unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen des abgesaugten Pensensaftes sowie im zeitlichen Abstand von der Pensensaftentnahme.

Tabelle 1: Ausfall der Methylenblauprobe bei unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen des abgeseugten Pansensaftes sowie im zeitlichen Abstand von der Pansensaftentnahme (Probe 1, Grauviehhuh; Probe 2, Schwarzbunte; Probe 3, Grauviehhuh, 2. Versuch)

Zeitpunkt der Unter- suchung nach der Entnahme	Aufbewahrung bei Zimmertemperatur und jeweilige Erwärmung auf 39°C			Aufbewahrung bei 39°C			Aufbewahrung bei Zimmertemperatur		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	Reduktionszeiten in Sekunden								
0	65	73	69	65	73	69	65	73	69
2 ^h	71	75	81	98	96	102	230	260	250
3 ^h	77	87	93	99	115	120	385	490	490
4 ^h	79	82	111	97	139	130	>30 min	>30 min	>30 min
6 ^h	107	88	129	208	230	254	>60 min	>60 min	>60 min
9 ^h	152	143	174	>30 min	>30 min	>30 min	--	--	--

Beide Versuchstiere erhielten 7 Tage lang eine Tagesration bestehend aus 6 kg Heu mittlerer Qualität, 4 kg Melasse-Trockenschnitzeln, 3 kg Gerstenschrot, 1 kg Milchleistungsfutter III (DLG-Norm) und 150 g Mineralstoffmischung. Laut DLG-Futterwerttabelle errechnen sich die unten angeführten Nährstoffgehalte in der Gesamtration:

	Trocken- substanz	Rohfaser	verd. Eiweiß	Stärke- einheiten
6 kg Heu	5 238	1 740	318	2 256
4 kg Melasse- Trockenschnitzel	3 616	564	244	2 220
3 kg Gersten- schrot	2 625	201	249	1 917
1 kg Milch- leistungsfutter	800	106	212	600
gesamt:	12 279	2 611	1 023	6 993

Der Rohfaseranteil der Trockensubstanz betrug 21,3%, das Eiweiß-Stärke-Verhältnis belief sich auf 1:6,8. Dies entspricht in etwa dem Nährstoffbedarf einer 650 kg schweren Kuh mit einer täglichen Milchleistung von 15 Litern bei einem Fettgehalt von 3,5%.

Am ersten Versuchstag erhielten die Kühe um 6 Uhr und um 14.30 Uhr jeweils eine halbe Tagesration gereicht. In dieser Zeit wurde, um 9 Uhr beginnend, alle 2 Stunden Pansensaft über die Pansenfistel abgesaugt und auf seine Reduktionsfähigkeit hin untersucht. Ab 14.30 Uhr wurde über 24 Stunden, bis um 15.15 Uhr des 2. Versuchstages, in 2stündigem Abstand die Methylenblauprobe durchgeführt. Die morgendliche Fütterung entfiel.

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 2 und den Diagrammen 2 und 3 aufgeführt: die Reduktionszeit, die unmittelbar vor der Fütterung um 14.30 Uhr, um 3 Minuten lag, verkürzte sich im Verlauf der folgenden 2½ Stunden auf einen Wert von 84 Sekunden bei der Schwarzbunten (Probe 1) und 68 Sekunden bei der Grauviehkühe (Probe 2). In den nächsten 8 Stunden verlängerte sich die Reduktionszeit kontinuierlich: nach 2 Stunden auf 116 Sekunden (Probe 1) und 114 Sekunden (Probe 2), nach 4 Stunden auf 152 Sekunden (Probe 1) und 136 Sekunden (Probe 2). Nach 6 Stunden reduzierte

Probe 1 die Methylenblaulösung in 168 Sekunden und Probe 2 in 151 Sekunden, nach 8 Stunden Probe 1 in 172 Sekunden und Probe 2 in 169 Sekunden. Bis Versuchsende, 14 Stunden später, schwankten die Reduktionszeiten ohne nennenswerte Abweichung bei Probe 1 um 3 Minuten, bei Probe 2 um $2\frac{3}{4}$ Minuten.

Der pH-Wert fiel kurz nach der Fütterung von pH 6,9 (Probe 1) und pH 6,8 (Probe 2) unmittelbar vor Aufnahme der Ration auf pH 6,2 für beide Proben ab und erreichte zwischen der 2. und 3. Stunde mit pH 6,0 (Probe 1) und pH 6,1 (Probe 2) den tiefsten Wert. Während der nachfolgenden 8 Stunden stieg der pH-Wert kontinuierlich bis pH 7,0 für beide Proben an, um sich in etwa auf diesem Niveau bis zur neuerlichen Futteraufnahme zu halten. Die Veränderungen des Pansensaftes in bezug auf Farbe, Geruch, Konsistenz, Sedimentation und Flotation, sowie den Gehalt an Protozoen liefen folgendermaßen ab:

Die Farbe des Vormageninhaltes, die vor Versuchsbeginn mittelbraun war, nahm schon bald einen hellbraungrünen Ton an. Zwischen der 3. und 5. Stunde wurde der Pansensaft braungrün, 2 Stunden später war er mittelbraun. 8 Stunden nach der Fütterung hatte der Vormageninhalt eine dunkelbraune Farbe, die bis Versuchsende bestehen blieb. Der Geruch, vor Versuchsbeginn aromatisch, verlor sich zwischen der 8. und 14. Stunde und wurde indifferent. Die Konsistenz des Pansensaftes war bis zur 10. Stunde leicht viskös, von da an mehr flüssig. Bis zur 6. Stunde sedimentierten die feinen Futterpartikel in normaler Zeit, im weiteren Verlauf war die Sedimentation beschleunigt. Ebenso stiegen die groben Faserbestandteile bis zur 6. Stunde mit normaler Geschwindigkeit auf und flotierten bis zur 10. Stunde relativ schnell. Während weiterer 6 Stunden verzögerte sich die Flotation und blieb dann bis Versuchsende aus. Die Protozoenzahl verminderte sich ab der 6. Stunde. Ab der 10. Stunde waren nur noch geringe Mengen, meist kleiner Infusorien nachzuweisen.

Verlauf der Methylenblaureduktion bei Heufütterung

Eine Woche nach Beendigung der Verlaufsuntersuchung bei Verfütterung einer gemischten Heu-Krafftuttermischung wurden die beiden Pansenfistelkühe ausschließlich auf Heu mäßiger Qualität umgestellt und die Auswirkung des Futterwechsels auf die Methylenblauprobe verfolgt.

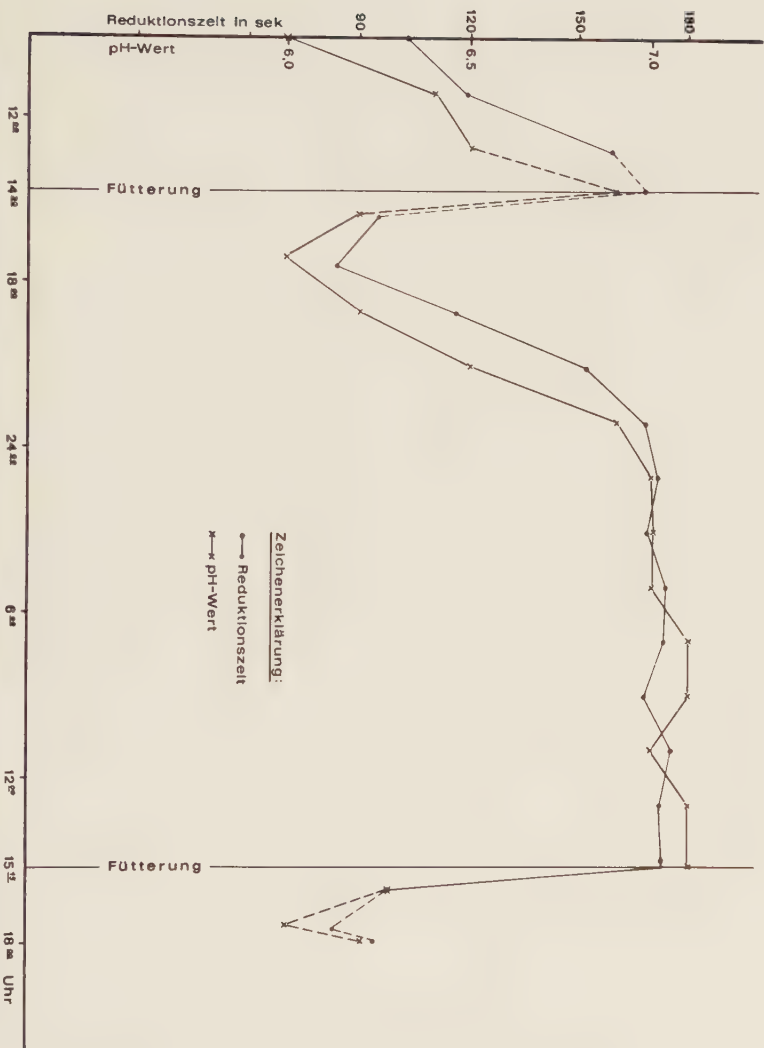


Diagramm 2: Ausfall der Methylenblauprobe und pH-Werte im Verlauf von 24 Stunden nach einmaliger Verabreichung einer gemischten Ration (Probe I, Schwarzbunte).

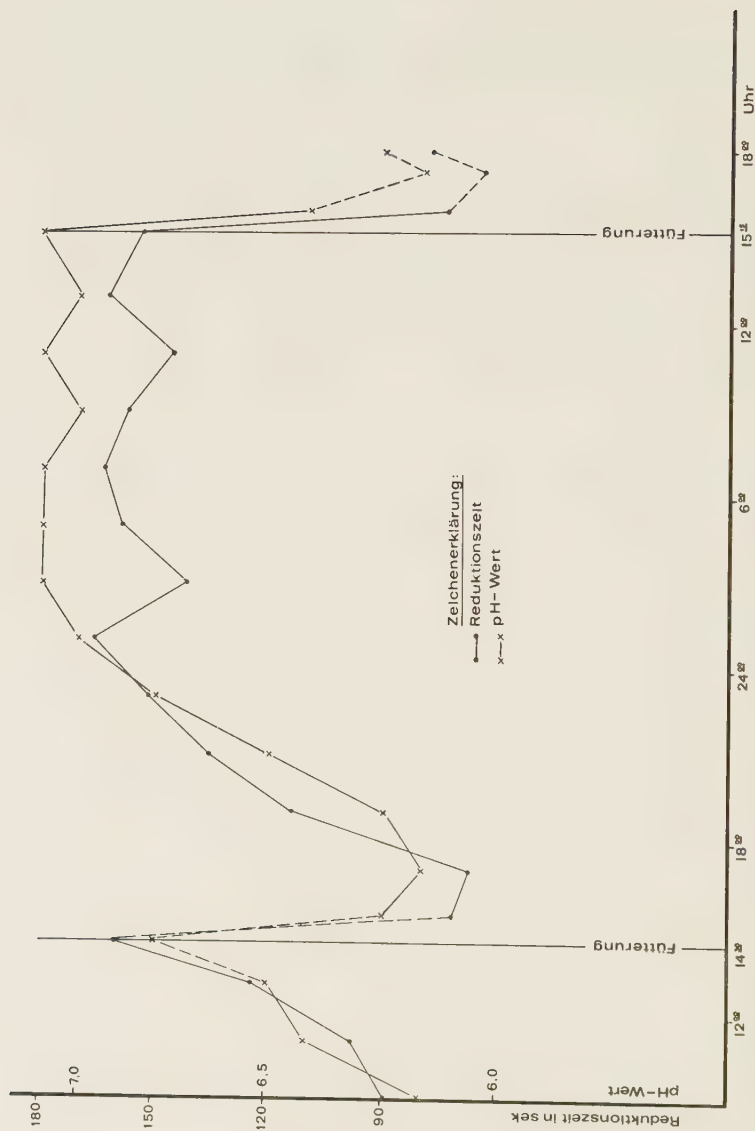


Diagramm 3: Ausfall der Methylenblauprobe und pH-Werte im Verlauf von 24 Stunden nach einmaliger Verabreichung einer gemischten Ration (Probet. Grauviehkuh)

Uhr- zeit der Ent- nahme	pH- Wert		Reduk- tions- zeit in Sekunden		Farbe	Geruch	Kon- sistenz	Sedimen- tation	Flota- tion	Proto- zoen
	1	2	1	2						
6 ⁰⁰	<u>Fütterung</u>									
9 ⁰⁰	6,0	6,1	103	89	hell- braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
11 ⁰⁰	6,4	6,4	119	98	braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
13 ⁰⁰	6,5	6,5	159	124	mittel- braun	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
14 ³⁰	6,9	6,8	170	160	mittel- braun	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
14 ³⁰	<u>Fütterung</u>									
15 ³⁰	6,2	6,2	95	72	hell- braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
17 ⁰⁰	6,0	6,1	84	68	braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
19 ⁰⁰	6,2	6,2	116	114	braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
21 ⁰⁰	6,5	6,5	152	136	mittel- braun	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
23 ⁰⁰	6,9	6,8	168	152	mittel- braun	schwach aroma- tisch	leicht visköse	beschleu- nigt	relativ schnell	++-
1 ⁰⁰	7,0	7,0	172	166	dunkel- braun	schwach aroma- tisch	mehr flüssig	beschleu- nigt	relativ schnell	++-
3 ⁰⁰	7,0	7,1	169	142	dunkel- braun	schwach aroma- tisch	mehr flüssig	beschleu- nigt	relativ schnell	++-
5 ⁰⁰	7,0	7,1	174	159	dunkel- braun	geruch- los	mehr flüssig	beschleu- nigt	relativ schnell	++-
7 ⁰⁰	7,1	7,1	173	164	dunkel- braun	geruch- los	mehr flüssig	beschleu- nigt	relativ schnell	++-
9 ⁰⁰	7,1	7,0	169	158	dunkel- braun	in- different	mehr flüssig	beschleu- nigt	relativ schnell	++-
11 ⁰⁰	7,0	7,1	175	146	dunkel- braun	in- different	mehr flüssig	beschleu- nigt	relativ schnell	++-
13 ⁰⁰	7,1	7,0	172	163	dunkel- braun	in- different	mehr flüssig	beschleu- nigt	relativ schnell	++-
15 ⁰⁰	7,1	7,1	174	154	dunkel- braun	in- different	mehr flüssig	beschleu- nigt	relativ schnell	++-
15 ¹⁵	<u>Fütterung</u>									
16 ⁰⁰	6,3	6,4	99	74	braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
18 ⁰⁰	6,2	6,2	94	78	hell- braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++

Tabelle 2: Ausfall der Methylenblauprobe im Verlauf von 24 Stunden nach einmaliger Verabreichung einer gemischten Ration sowie die pH-Werte und die makroskopischen und mikroskopischen Pansen-saftbefunde (Probe 1, Schwarzbunte; Probe 2, Grauviehhuh)

Bei Versuchsbeginn erhielten die Pansenfistelkühe morgens um 7 Uhr zum letztenmal die zuvor genannte gemischte Ration, zu welcher Heu in beliebiger Menge aufgelegt wurde. Während der nächsten 7 Tage hatten die Kühe lediglich Gelegenheit, Heu ad libitum aufzunehmen. Zwischen 8 Uhr und 9 Uhr, zwischen 13 Uhr und 13.30 Uhr und zwischen 16 Uhr und 16.30 Uhr wurde Pansensaft entnommen und die Methylenblauprobe durchgeführt.

Da bei Versuchsbeginn keine Pansensaftprobe entnommen werden konnte, wurde als Ausgangswert pH 6,7 und eine Entfärbezeit von 170 Sekunden (Probe 1) und 160 Sekunden (Probe 2) eingesetzt, wie sie bei der Ermittlung der Bezugswerte für die Beurteilung der Methylenblauprobe festgestellt wurden (siehe Tabelle 3 und Diagramme 4 und 5). Im Verlauf der ersten 2 Stunden verkürzte sich die Reduktionszeit auf Werte von 67 Sekunden für die Schwarzbunte (Probe 1) und 54 Sekunden für die Grauviehkühe (Probe 2). Ab der 3. Stunde des ersten Versuchstages bis zur mittäglichen Kontrolle des 4. Tages verlängerten sich die Reduktionszeiten kontinuierlich bis auf Werte von 430 Sekunden (Probe 1) und 365 Sekunden (Probe 2). Nachmittags wurden in etwa gleiche Entfärbezeiten gemessen. Bis zum Mittag des 5. Tages verzögerte sich die Reduktionszeit auf 11 Minuten (Probe 1) und 10 Minuten (Probe 2). Auch hier wurden nachmittags gleiche Meßwerte ermittelt. Während der folgenden Nacht ließ die Reduktionskraft des Pansensaftes merklich nach, was durch Entfärbezeiten von 17 Minuten (Probe 1) und 15 Minuten (Probe 2) bestätigt wurde. Im Verlauf des 6. und 7. Tages pendelten sich die Reduktionszeiten zwischen 18 und 20 Minuten (Probe 1) und 15 und 17 Minuten (Probe 2) ein.

Im Zusammenhang mit den stagnierenden Meßwerten zwischen den Mittag- und Abendkontrollen steht die Beobachtung, daß die Versuchskühe vornehmlich um die Mittagsstunden größere Heumengen zu sich nahmen, was zu einer Anregung der biochemischen Verdauungsprozesse mit Steigerung des Reduktionsvermögens führt. Dadurch wird das weitere Nachlassen der Reduktionskraft für kurze Zeit aufgefangen.

Der pH-Wert sank während der ersten 2 Stunden auf pH 6,0 (Probe 1 und 2) ab, stieg bis zur morgendlichen Pansensaftentnahme am 2. Tag auf pH 6,7 (Probe 1 und 2) an und pendelte bis Versuchsende um diesen pH-Wert.

Nach 1½ Tagen hatte der Untersuchungsbefund des Pansensaftes eine Konstanz erreicht, da der Wechsel in den verschiedenen Untersuchungskriterien des Vormageninhalts nach der Umstellung auf Heufütterung weitgehend abgeschlossen war.

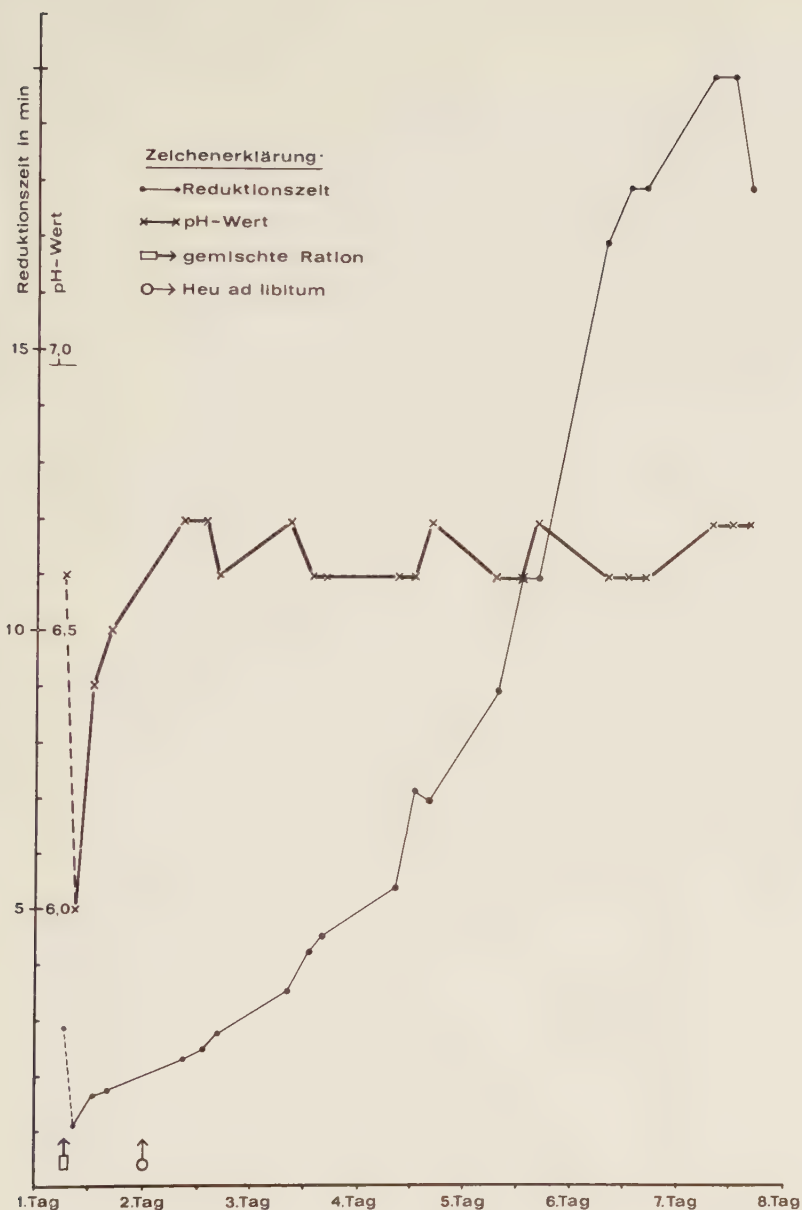


Diagramm 4: Ausfall der Methylenblauprobe und pH-Verlauf im Pansensaft nach Übergang von einer gemischten Ration zu Heu ad libitum (Probe 1, Schwarzbunte).

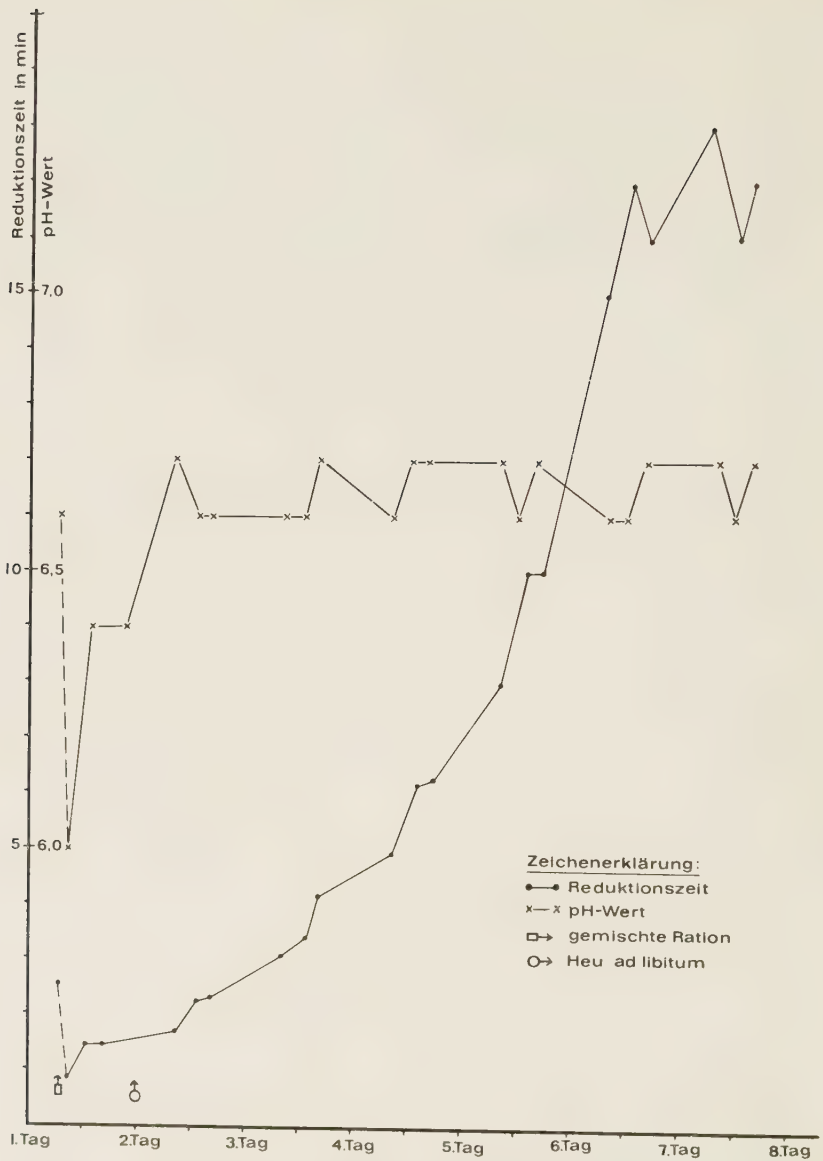


Diagramm 5: Ausfall der Methylenblauprobe und pH-Verlauf im Pansensaft nach Übergang von einer gemischten Ration zu Heu ad libitum (Probe 2, Grauviehkueh).

Tag und Uhr- zeit der Ent- nahme	pH- Wert		Reduk- tions- zeit in Sekunden		Farbe	Geruch	Kon- sistenz	Sedimen- tation	Flota- tion	Proto- zoen
	1	2	1	2						
<u>1. Tag</u>										
7 ⁰⁰	6,6	6,6	170	160	mittel- braun	aroma- tisch	leicht viskös	normal	normal	+++
7 ⁰⁰					<u>Fütterung</u>					
9 ⁰⁰	6,0	6,0	67	54	hell- braungrün	aroma- tisch	leicht viskös	normal	normal	+++
13 ³⁰	6,4	6,4	99	87	braungrün	aroma- tisch	leicht viskös	normal	normal	+++
16 ⁰⁰	6,5	6,4	103	87	mittel- braun	schwach aroma- tisch	leicht viskös	normal	normal	+++
<u>2. Tag</u>					<u>Umstellung auf Heu ad libitum</u>					
9 ⁰⁰	6,7	6,7	139	102	mittel- braun	schwach aroma- tisch	leicht viskös	normal	normal	+++
13 ⁰⁰	6,7	6,6	150	132	mittel- braun	geruch- los	mehr flüßig	beschleu- nigt	relativ schnell	++
16 ¹⁵	6,6	6,6	168	139	dunkel- braun	geruch- los	mehr flüßig	beschleu- nigt	relativ schnell	++
<u>3. Tag</u>										
9 ⁰⁰	6,7	6,6	217	186	dunkel- braun	in- different	mehr flüßig	beschleu- nigt	relativ schnell	++
13 ⁰⁰	6,6	6,6	255	209	dunkel- braun	in- different	mehr flüßig	beschleu- nigt	relativ schnell	++
16 ³⁰	6,6	6,7	276	248	dunkel- braun	in- different	wässrig	beschleu- nigt	ver- zögert	++
<u>4. Tag</u>										
9 ⁰⁰	6,6	6,6	325	295	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	beschleu- nigt	ver- zögert	++
13 ⁰⁰	6,6	6,7	430	365	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	beschleu- nigt	ver- zögert	++
16 ³⁰	6,7	6,7	420	370	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	beschleu- nigt	aus- bleibend	+-
<u>5. Tag</u>										
8 ⁴⁵	6,6	6,7	9 min	8 min	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
13 ¹⁵	6,6	6,6	11 min	10 min	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
16 ³⁰	6,7	6,7	11 min	10 min	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
<u>6. Tag</u>										
8 ⁰⁰	6,6	6,6	17 min	15 min	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
13 ¹⁵	6,6	6,6	18 min	17 min	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
16 ⁰⁰	6,6	6,7	18 min	16 min	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
<u>7. Tag</u>										
8 ¹⁵	6,7	6,7	20 min	18 min	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
13 ¹⁵	6,7	6,6	20 min	16 min	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
16 ⁰⁰	6,7	6,7	18 min	17 min	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
16 ⁰⁰					<u>Fütterung</u>					

Tabelle 3: Ausfall der Methylenblauprobe, die pH-Werte im Vormageninhalt sowie die makroskopischen und mikroskopischen Pansen-saftbefunde nach Übergang von einer gemischten Ration zu Heu ad libitum (Probe 1, Schwarzbunte; Probe 2, Grauviehhuh)

Nachdem die Reduktionszeiten im Verlauf des 7. Tages einen konstanten Wert angenommen hatten, wurde den Versuchskühen nach Absaugen des Pansensaftes zur Abenduntersuchung wieder eine gemischte Ration bekannter Zusammensetzung verabreicht.

Verlauf der Methylenblaureduktion bei Strohfütterung

Um die Auswirkungen einer ausgeprägt nährstoffarmen Fütterung auf die Reduktionszeit zu prüfen, wurden die beiden Pansenfistelkühe ausschließlich auf Stroh zur freien Aufnahme umgestellt.

Bei Versuchsbeginn erhielten die Tiere um 6.30 Uhr zum letztenmal eine gemischte Ration, anschließend Stroh ad libitum angeboten. In den folgenden 5 Tagen wurde jeweils zwischen 8.15 Uhr und 8.30 Uhr, zwischen 12.15 Uhr und 13.30 Uhr sowie zwischen 16.15 Uhr und 16.30 Uhr, am 6. Tag um 12 Uhr und am 7. Tag um 13 Uhr die Methylenblauprobe durchgeführt.

Als sich die Methylenblaureduktionszeiten auf über 17 Minuten verzögert hatten, wurde bei der Mittags- und Nachmittagsfütterung des 4. Tages und der Morgenfütterung des 5. Tages den Versuchskühen 2 kg bzw. 1,5 kg Sojaschrot zum Stroh zugefüttert. Damit sollte geprüft werden, in welchem Zeitraum durch Beifütterung eiweißreichen Sojaschrots die Pansenflora soweit aktiviert werden konnte, um bei der Methylenblauprobe Normalwerte zu erhalten.

Wie aus der Tabelle 4 und den Diagrammen 6 und 7 zu entnehmen ist, trat nach anfänglicher Verkürzung der Reduktionszeit während der ersten 2 Stunden auf 87 Sekunden für die Schwarzbunte (Probe 1) und 74 Sekunden für die Grauviehkühe (Probe 2), in den folgenden 1½ Tagen eine kontinuierliche Verlängerung bis auf 188 Sekunden (Probe 1) und 164 Sekunden (Probe 2) ein. Dann ließ die Aktivität des Pansensaftes plötzlich stark nach, und die Reduktionszeiten verzögerten sich in den nächsten 2 Tagen auf 17 Minuten (Probe 1) und 16 Minuten (Probe 2). Schon nach einmaliger Verabreichung von 2 kg Sojaschrot erholte sich die Reduktionskraft des Panseninhaltes derart, daß sich die Entfärbezeiten innerhalb von 4 Stunden auf 230 Sekunden (Probe 1) und 195 Sekunden (Probe 2) verkürzten. Nach einer nochmaligen Sojaschrot-Zulage wurde am nächsten Morgen eine nur geringfügige Verlängerung der Reduktionszeit auf 280 Sekunden (Probe 1) und 260 Sekunden (Probe 2) gemessen. 2 Tage nach einer neuerlichen Sojaschrot-Zufütterung

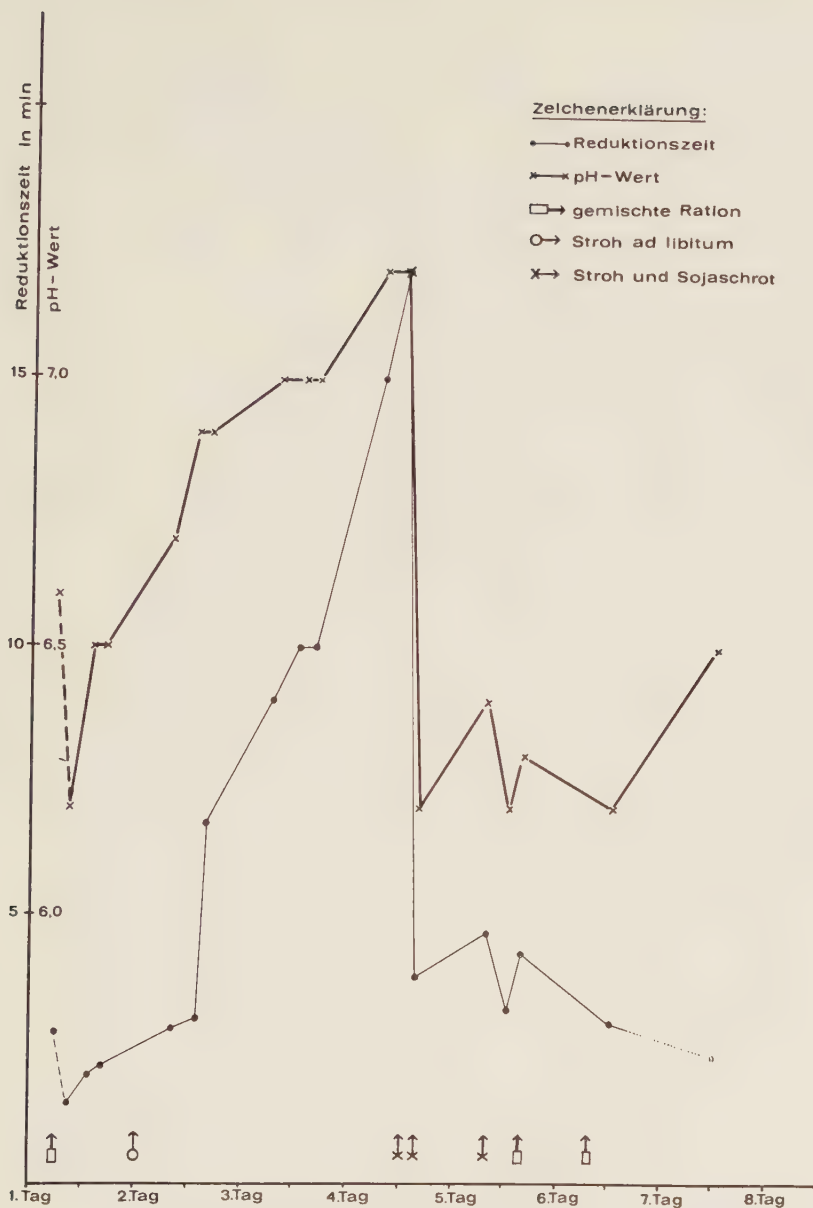


Diagramm 6: Ausfall der Methylenblauprobe und pH-Verlauf im Pansensaft nach Übergang von einer gemischten Ration zu Stroh ad libitum und anschließender Zulage von Sojaschrot (Probe 1, Schwarzbunte).

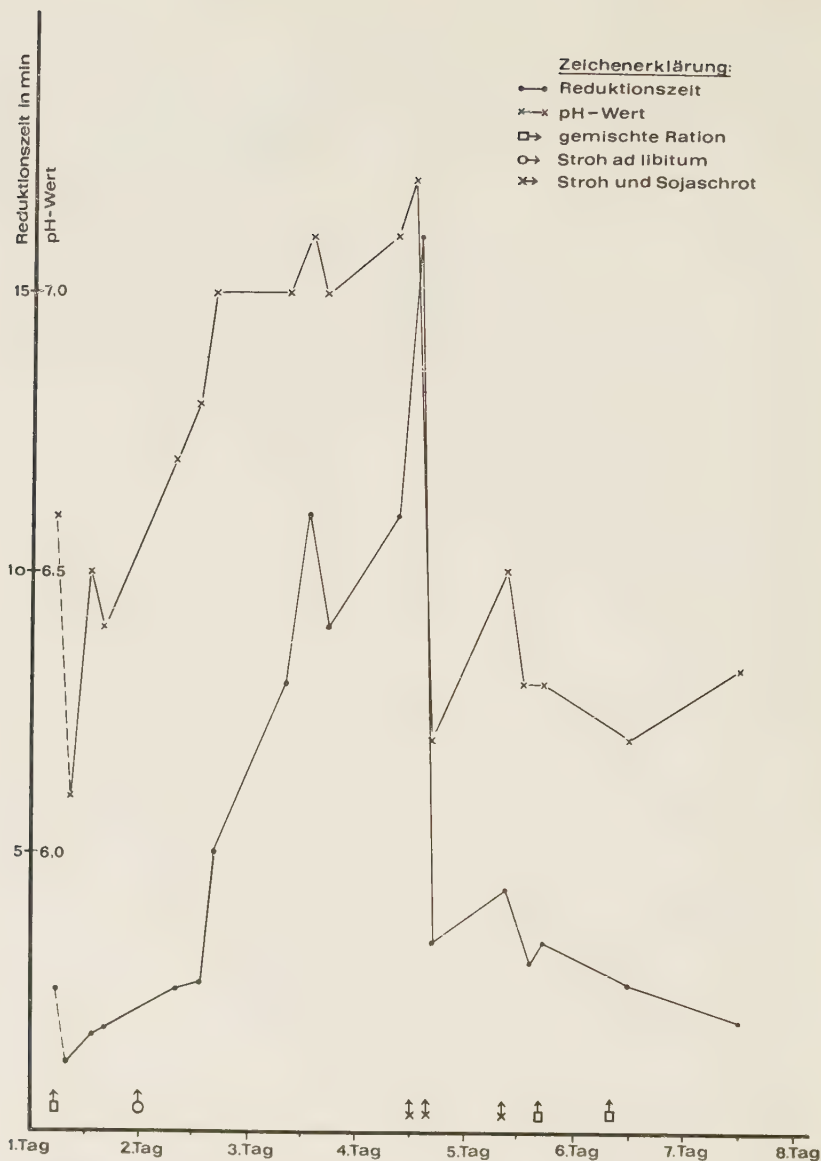


Diagramm 7: Ausfall der Methylenblauprobe und pH-Verlauf im Pansensaft nach Übergang von einer gemischten Ration zu Stroh ad libitum und anschließender Zulage von Sojaschrot (Pr. 2, Grauviehhuh).

Tag und Uhr- zeit der Ent- nahme	pH- Wert		Reduk- tions- zeit in Sekunden		Farbe	Geruch	Kon- sistenz	Sedimen- tation	Flota- tion	Proto- zoen
	1	2	1	2						
<u>1. Tag</u>										
6 ³⁰	6,6	6,6	170	160	mittel- braun	aroma- tisch	leicht viskös	normal	normal	+++
6 ³⁰					<u>Fütterung</u>					
8 ³⁰	6,2	6,1	87	74	hell- braungrün	aroma- tisch	leicht viskös	normal	normal	+++
13 ³⁰	6,5	6,5	122	101	braungrün	aroma- tisch	leicht viskös	normal	normal	+++
16 ¹⁵	6,4	6,4	133	107	mittel- braun	schwach aroma- tisch	mehr flußig	beschleu- nigt	relativ schnell	+++
<u>2. Tag</u>					<u>Umstellung</u> auf Stroh ad libitum					
8 ¹⁵	6,7	6,7	172	157	mittel- braun	geruch- los	mehr flußig	beschleu- nigt	relativ schnell	++
13 ¹⁵	6,9	6,8	188	164	dunkel- braun	in- different	wässrig	rasch	ver- zögert	++
16 ¹⁵	6,9	7,0	400	300	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	ver- zögert	++
<u>3. Tag</u>										
8 ³⁰	7,0	7,1	9 min	8 min	dunkel- braun	etwas stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	++
12 ⁴⁵	7,0	7,1	10 min	11 min	dunkel- braun	stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	++
16 ⁰⁰	7,0	7,0	10 min	9 min	dunkel- braun	stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	++
<u>4. Tag</u>										
8 ³⁰	7,2	7,1	15 min	11 min	mittel- braun	stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	++
12 ¹⁵	7,2	7,2	17 min	16 min	dunkel- braun	stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	++
12 ³⁰					<u>Fütterung:</u> Stroh und 2 kg Sojaschrot					
16 ¹⁵	6,2	6,2	230	195	hellgrün	etwas stechend	mehr flußig	normal	normal	++
<u>5. Tag</u>										
8 ¹⁵	6,4	6,5	280	260	grün	etwas stechend	mehr flußig	normal	normal	++
8 ³⁰					<u>Fütterung:</u> Stroh und 1,5 kg Sojaschrot					
13 ⁰⁰	6,2	6,3	195	180	grün	etwas stechend	leicht viskös	normal	normal	+++
16 ¹⁵	6,3	6,3	235	195	grünbraun	etwas stechend	leicht viskös	normal	normal	+++
16 ³⁰					<u>Fütterung:</u> Stroh und 1,5 kg Sojaschrot					
<u>6. Tag</u>										
7 ⁰⁰					<u>Fütterung</u>					
12 ⁰⁰	6,2	6,2	180	160	braungrün	etwas stechend	leicht viskös	normal	normal	+++
15 ⁰⁰					<u>Fütterung</u>					
<u>7. Tag</u>										
6 ⁰⁰					<u>Fütterung</u>					
13 ⁰⁰	6,5	6,4	147	118	braungrün	aroma- tisch	leicht viskös	normal	normal	+++

Tabelle 4: Ausfall der Methylenblauprobe, pH-Verlauf sowie die makroskopischen und mikroskopischen Pansen-saftbefunde nach Übergang von einer gemischten Ration zu Stroh ad libitum und anschließender Zulage von Sojaschrot (Probe 1, Schwarzbunte;

hatte sich der Pansensaft soweit erholt, daß mit 195 Sekunden (Probe 1) und 180 Sekunden (Probe 2) Entfärbezeiten ermittelt werden konnten, die an der oberen Grenze des Normalbereiches liegen. Die Umstellung der Fütterung auf eine gemischte Ration (siehe vorn) führte nach 24 Stunden zu einer Verkürzung der Reduktionszeit auf 180 Sekunden (Probe 1) und 160 Sekunden (Probe 2), nach einem weiteren Tag auf 147 Sekunden (Probe 1) und 118 Sekunden (Probe 2).

Ein bemerkenswertes Bild bot der Verlauf des pH-Wertes. Dem Abfall von pH 6,6 auf pH 6,2 (Probe 1) und pH 6,1 (Probe 2) während der ersten beiden Stunden folgte ein gleichmäßiger Anstieg bis pH 6,9 (beide Proben), der nach 1½ Tagen erreicht war. Beim plötzlichen Nachlassen der Pansenaktivität (siehe oben) schlug der pH-Wert ins Alkalische um. Nach der ersten Sojaschrot-Zulage fiel innerhalb 4 Stunden der pH-Wert auf pH 6,2 (beide Proben) und pendelte sich bis Versuchsende zwischen pH 6,2 und pH 6,3 (Probe 1 und 2) ein.

Während die Reduktionswerte nach 1 Tag mit etwa 3 Minuten Entfärbezeit noch denen eines aktiven Pansensaftes entsprachen, machten sich in den grobsinnlichen Veränderungen bereits die Auswirkungen der nährstoffarmen Strohütterung bemerkbar. Schon 4 Stunden nach Sojaschrot-Zulage konnte eine deutliche Tendenz zur Normalisierung der makroskopischen Befunde des Vormageninhaltes festgestellt werden: die Farbe war ins Grüne umgeschlagen, Sedimentation und Flotation hatten sich normalisiert, und reichlich Protozoen konnten nachgewiesen werden. Lediglich der Geruch deutete noch 2 Tage lang auf eine vorangegangene Inaktivität des Pansensaftes hin.

Verlauf der Methylenblaureduktion nach intraruminaler Verabreichung von Chlortetrazyklin in steigender Dosis

Im nachfolgend beschriebenen Versuch sollte die Beeinträchtigung des Redoxpotentials im Pansensaft durch intraruminale Verabreichung von Antibiotika in steigender Dosis geprüft werden. Als Antibiotikum wurde Chlortetrazyklin in Form des „Aureomycin-Supplement-Cyanamid“ verwendet.

Vor Versuchsbeginn wurde den beiden Pansenfistelkühen solange eine gemischte Heu-Kraftfütterration (s. vorne) verabreicht, bis die Reduktionszeiten eine Woche lang im Normalbereich lagen und nur unwesentlich differierten. Sodann wurde an den folgenden 8 Versuchstagen um 8 Uhr und um



Diagramm 8: Ausfall der Methylenblauprobe nach intraruminaler Verabreichung von Chlortetrazyklin in steigender Dosis von 2 g, 3 g, 5 g und 10 g (Probe 1, Schwarzbunte).

15.05 Uhr jeweils eine Normalration verfüttert. Dazu wurde den Kühen an 4 aufeinanderfolgenden Tagen, beginnend am 2. Versuchstag, jeweils um 10.05 Uhr, am 2. Tag 2 g, am 3. Tag 3 g, am 4. Tag 5 g und am 5. Tag 10 g Chlortetrazyklin über die Pansenfistel eingegeben, wobei 1 g Chlortetrazyklin in 22,73 g „Aureomycin-Supplement-Cyanamid“ enthalten ist:

2 g Chlortetrazyklin = 44,5 g „Aureomycin-Supplement“

3 g Chlortetrazyklin = 68,2 g „Aureomycin-Supplement“

5 g Chlortetrazyklin = 113,5 g „Aureomycin-Supplement“

10 g Chlortetrazyklin = 227,3 g „Aureomycin-Supplement“

Die Entnahme des Pansensaftes zur Durchführung der Methylenblauprobe erfolgte an den ersten 5 Tagen um 9 Uhr, um 10 Uhr, um 13 Uhr und um 15 Uhr, am 6. und 7. Tag um 12 Uhr und am 8. Tag um 13 Uhr.

Aus der zusammenfassenden Darstellung der Ergebnisse in Tabelle 5 und Diagramm 8 und 9 geht hervor, daß sich die Reduktionszeit, die unmittelbar vor Versuchsbeginn bei 125 Sekunden für die Schwarzbunte (Probe 1) und 99 Sekunden für die Grauviehh Kuh lag, nach 1 Stunde auf ein Minimum von 94 Sekunden (Probe 1) und 82 Sekunden (Probe 2) verkürzte und sich darauf bis zur Nachmittagsfütterung auf 125 Sekunden (Probe 1) und 109 Sekunden (Probe 2) verlängerte.

2 Stunden nach der Morgenfütterung des 2. Tages, also unmittelbar vor der intraruminalen Verabreichung von 2 g Chlortetrazyklin um 10 Uhr, hatten sich die Reduktionszeiten des Pansensaftes auf 82 Sekunden (Probe 1) und 67 Sekunden (Probe 2) verkürzt und verlängerten sich bis um 15 Uhr auf 125 Sekunden (Probe 1) und 109 Sekunden (Probe 2). Am 3. Tag betrugen die Entfärbezeiten 2 Stunden nach der Morgenfütterung 95 Sekunden (Probe 1) und 75 Sekunden (Probe 2). Um 10 Uhr wurden 3 g Chlortetrazyklin über die Pansenfistel verabreicht. Bis zur 15-Uhr-Fütterung hatten sich die Reduktionszeiten auf 183 Sekunden (Probe 1) und 162 Sekunden (Probe 2) verlängert. Unmittelbar vor der intraruminalen Verabreichung von 5 g Chlortetrazyklin am 4. Tag lagen die Entfärbezeiten bei 89 Sekunden (Probe 1) und 82 Sekunden (Probe 2), vor der 15-Uhr-Fütterung bei 204 Sekunden (Probe 1) und 191 Sekunden (Probe 2), am 5. Tag vor Verabreichung von 10 g Chlortetrazyklin bei 99 Sekunden (Probe 1) und 83 Sekunden (Probe 2) und vor der Nachmittagsfütterung bei 243 Sekunden (Probe 1) und 222 Sekunden (Probe 2). Am 6. Tag wurden um 12 Uhr Reduktionszeiten von 257 Sekunden (Probe 1) und 202 Sekunden (Probe 2), am 7. Tag um 12 Uhr

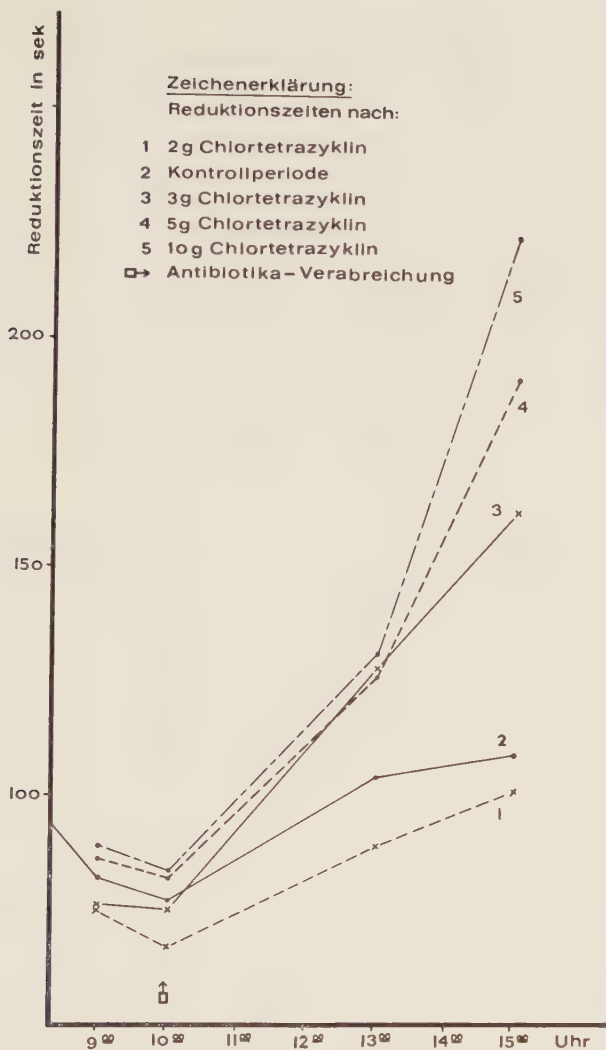


Diagramm 9: Ausfall der Methylenblauprobe nach intraruminaler Verabreichung von Chlortetrazyklin in steigender Dosis von 2 g, 3 g, 5 g und 10 g (Probe 2, Grauviehhuh).

Tag und Uhr- zeit der Ent- nahme	pH- Wert		Reduk- tions- zeit in Sekunden		Farbe	Geruch	Kon- sistenz	Sedimen- tation	Flota- tion	Proto- zoen
	1	2	1	2						
8 ⁰⁰	6,9	6,9	123	99	mittel- braun	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
8 ⁰⁵	<u>Fütterung</u>									
9 ⁰⁰	6,2	6,2	94	82	hell- braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
10 ⁰⁰	6,3	6,3	97	77	hell- braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
13 ⁰⁰	6,6	6,7	121	104	mittel- braun	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
15 ⁰⁰	6,8	6,9	125	109	dunkel- braun	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
15 ⁰⁵	<u>Fütterung</u>									
<u>2. Tag</u>										
8 ⁰⁰	<u>Fütterung</u>									
9 ⁰⁰	6,7	6,7	93	75	mittel- braun	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
10 ⁰⁰	6,3	6,4	82	67	hell- braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
10 ⁰⁵	<u>2 g Chlortetracyclin per fist.</u>									
13 ⁰⁰	6,7	6,8	108	89	mittel- braun	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
15 ⁰⁰	6,7	6,8	123	101	dunkel- braun	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
15 ⁰⁵	<u>Fütterung</u>									
<u>3. Tag</u>										
8 ⁰⁰	<u>Fütterung</u>									
9 ⁰⁰	6,7	6,8	98	76	mittel- braun	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
10 ⁰⁰	6,4	6,4	95	75	hell- braungrün	aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
10 ⁰⁰	<u>3 g Chlortetracyclin per fist.</u>									
13 ⁰⁰	6,7	6,7	153	128	mittel- braun	schwach aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
15 ⁰⁰	6,8	6,9	183	162	dunkel- braun	schwach aroma- tisch	mehr flüssig	beschleunigt	verzögert	++-
15 ⁰⁵	<u>Fütterung</u>									

Tabelle 5, Fortsetzung nächste Seite

Tag und Uhr- zeit der Ent- nahme	pH- Wert		Reduk- tions- zeit in Sekunden		Farbe	Geruch	Kon- sistenz	Sedimen- tation	Flota- tion	Proto- zoen
	1	2	1	2						
<u>4. Tag</u>										
8 ⁰⁰					<u>Fütterung</u>					
9 ⁰⁰	6,9	6,8	97	86	dunkel- braun	schwach aroma- tisch	leicht viskös	beschleu- nigt	relativ schnell	+++
10 ⁰⁰	6,4	6,3	89	82	braungrün	schwach aroma-	leicht viskös	beschleu- nigt	relativ schnell	+++
10 ⁰⁵					<u>5 g Chlortetracyklin per fist.</u>					
13 ⁰⁰	6,5	6,5	142	126	dunkel- braun	in- different	mehr flüssig	rasch	ver- zögert	++
15 ⁰⁰	6,7	6,7	204	191	dunkel- braun	in- different	mehr flüssig	rasch	aus- bleibend	++
15 ⁰⁵					<u>Fütterung</u>					
<u>5. Tag</u>										
8 ⁰⁰					<u>Fütterung</u>					
9 ⁰⁰	6,6	6,7	101	89	mittel- braun	in- different	mehr flüssig	beschleu- nigt	ver- zögert	+++
10 ⁰⁰	6,3	6,4	99	83	braungrün	fade	wässrig	rasch	aus- bleibend	++
10 ⁰⁵					<u>10 g Chlortetracyklin per fist.</u>					
13 ⁰⁰	6,6	6,6	156	131	dunkel- braun	fade	wässrig	rasch	aus- bleibend	++
15 ⁰⁰	6,7	6,8	243	222	dunkel- braun	fade	wässrig	rasch	aus- bleibend	++
15 ⁰⁵					<u>Fütterung</u>					
<u>6. Tag</u>										
12 ⁰⁰	6,4	6,4	257	202	mittel- braun	in- different	mehr flüssig	rasch	ver- zögert	++
<u>7. Tag</u>										
12 ⁰⁰	6,5	6,4	262	214	mittel- braun	in- different	mehr flüssig	beschleu- nigt	ver- zögert	++
<u>8. Tag</u>										
13 ⁰⁰	6,2	6,2	104	100	braungrün	schwach aroma- tisch	leicht viskös	beschleu- nigt	ver- zögert	++

Tabelle 5: Ausfall der Methylenblauprobe, pH-Verlauf sowie die makroskopischen und mikroskopischen Pansen-saftbefunde nach intraruminaler Verabreichung von Chlortetracyklin in steigenden Dosen von 2g, 3g, 5g und 10g an 4 aufeinanderfolgenden Tagen (Probe 1, Schwarzbunte; Probe 2, Grauviehhuh)

von 272 bzw. 214 Sekunden (Probe 1 bzw. 2) und am 8. Tag um 13 Uhr von 124 Sekunden (Probe 1) und 104 Sekunden (Probe 2) ermittelt.

Unabhängig von der Chlortetrazyklin-Verabreichung zeigte der pH-Wert an allen Versuchstagen einen einheitlichen Verlauf. Nach der Morgenfütterung fiel der pH-Wert während der nächsten 2 Stunden mit pH 6,3 bzw. pH 6,4 (beide Proben) auf seinen tiefsten Stand und stieg bis zur neuerlichen Futteraufnahme um 15 Uhr kontinuierlich auf pH 6,7 bis pH 6,8 an.

Bei der Auswertung der Diagramme läßt sich zusammenfassend feststellen: Die Applikation von 2 g Chlortetrazyklin wirkt sich nicht in einer Verlängerung der Reduktionszeiten im Vergleich zur Kontrollperiode aus. Werden 3 g, 5 g oder 10 g Chlortetrazyklin eingegeben, verzögert sich der Methylenblauabbau in den ersten 3 Stunden parallel um etwa 30 Sekunden zum Bezugswert der Kontrollperiode. Weitere 2 Stunden divergieren die Reduktionszeiten: bei 3 g Chlortetrazyklin verlängern sich die Entfärbezeiten um etwa 30 Sekunden, bei 5 g Antibiotikum um etwa 60 Sekunden und bei 10 g Chlortetrazyklin um etwa 90 Sekunden. Bei Verabreichung von 2 g, 3 g und 5 g Antibiotikum ist die anfängliche Verzögerung bis zum nächsten Morgen wieder ausgeglichen. Nach Applikation von 10 g Chlortetrazyklin war die biochemische Aktivität des Vormageninhaltes, soweit dies im Ausfall der Methylenblauprobe erkennbar ist, 2 Tage gestört. Am 3. Tag hatte der Pansen saft seine volle Reduktionskraft wiedererlangt.

Verlauf der Methylenblaureduktion bei experimentell erzeugter Pansenazidose

Nachdem die Pansenflora der beiden Versuchskühe durch mehrwöchige Vorbereitungs fütterung an die bereits beschriebene Ausgangsration mit 23,3 % Rohfaseranteil in der Trockensubstanz angepaßt worden war, erhielten die Tiere bei gleichzeitigem Futterentzug 4 kg Zucker in Wasser gelöst durch die Pansenfistel intraruminal appliziert, um die Auswirkung einer fortschreitenden Säuerung des Vormageninhaltes auf die Methylenblauprobe darzustellen. In den folgenden 12 Stunden wurde stündlich Vormageninhalt abgesaugt, beurteilt und die Methylenblauprobe durchgeführt.

Nach der tabellarischen Darstellung (Tabelle 7) und dem Diagramm 10 folgte einer Verkürzung der Reduktionszeit während der ersten Stunde bis auf ein Minimum von 56 Sekunden für die Schwarzbunte (Probe 1) und 49 Sekunden

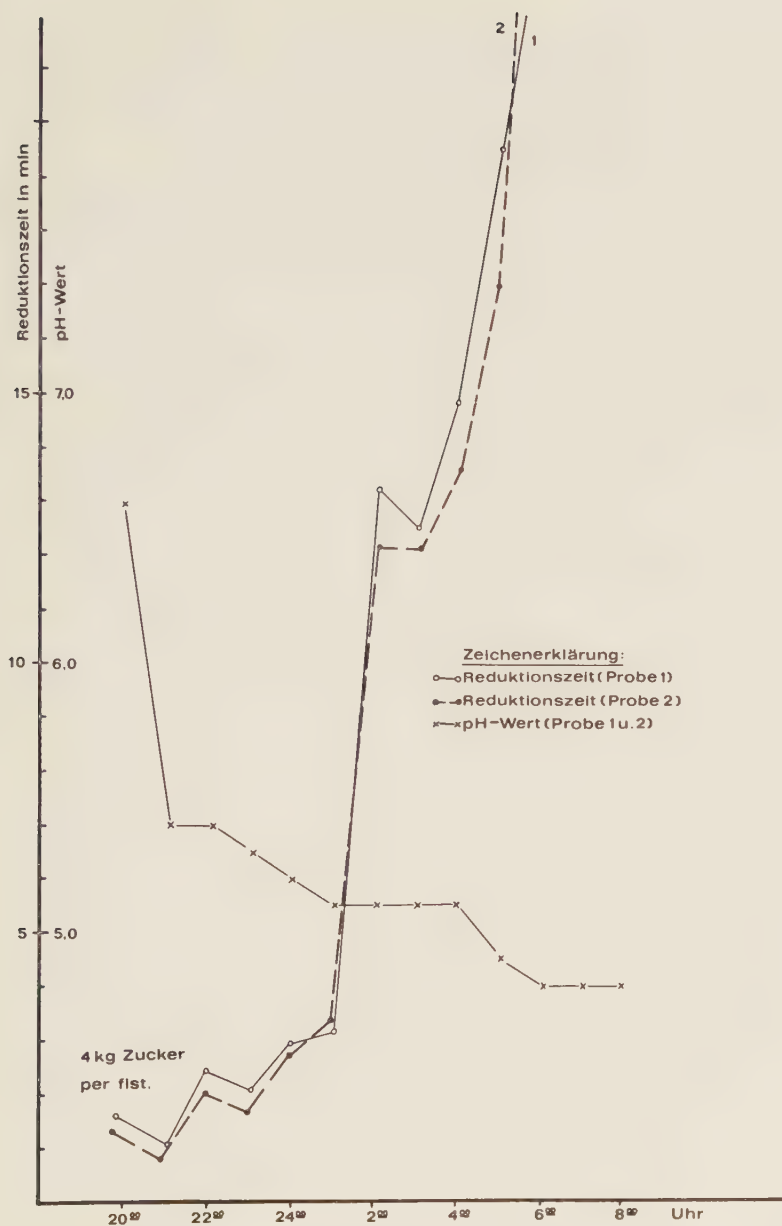


Diagramm 10: Ausfall der Methylenblauprobe und pH-Verlauf bei experimentell erzeugter Pansenazidose. (Probe 1, Schwarzbunte; Probe 2, Grauviehhuh.)

für die Grauviehhuh (Probe 2) eine kontinuierliche Verzögerung des Abbaus in den nächsten 4 Stunden bis auf Werte von 184 Sekunden (Probe 1) und 197 Sekunden (Probe 2). Zwischen der 5. und 6. Stunde verlangsamte sich die Reduktionszeit plötzlich auf $13\frac{1}{2}$ Minuten (Probe 1) und 12 Minuten (Probe 2) und verringerte sich während der nächsten Stunde geringfügig. 10 Stunden nach der Zucker-Applikation wurde die Methylenblaulösung erst nach über 30 Minuten, 1 Stunde später nach über 60 Minuten entfärbt.

Die pH-Linien erscheinen in der graphischen Darstellung in kreuzendem Verlauf zum Ausfall der Methylenblauproben. Nach steilem Abfall des pH-Wertes während der ersten Stunde von pH 6,6 auf pH 5,4, verflachten die pH-Linien und langten bis zur 5. Stunde bei einem pH-Wert von pH 5,1 an. 3 Stunden lang veränderte sich der pH-Wert des Vormageninhaltes nicht. Im Verlauf der 9. und 10. Stunde fielen die pH-Werte dann auf pH 4,8 ab.

Die schnelle Säuerung des Pansensaftes drückte sich charakteristisch in dessen Veränderungen aus. Die braungrüne Farbe des vollreduzierenden Vormageninhaltes vor Versuchsbeginn schlug bereits nach einer Stunde in grün, nach weiteren 3 Stunden in grüngrau um und hatte 5 Stunden nach Verabreichung des Zuckers eine milchiggraue Farbe angenommen. Während der Geruch des Pansensaftes, nach einer Stunde leicht stechend riechend, nach 7 Stunden in sauerstechend überging, verwässerte der Vormageninhalt anfangs schnell und war in der 6. Stunde stark-wässrig geworden. Die Sedimentation beschleunigte sich rasch, die Flotation verzögerte sich nach 3 Stunden und blieb nach 5 Stunden aus. Kontinuierlich verringerte sich die Anzahl der Infusorien: nach 6 Stunden waren, bei einem pH von 5,1, nur noch vereinzelt Protozoen auszumachen.

Besondere Beachtung wurde dem Allgemeinbefinden der Tiere geschenkt, um den resorptiven Folgen der Pansenazidose rechtzeitig begegnen zu können. So wurde den Versuchskühen unmittelbar vor Versuchsbeginn eine einmalige Gabe von 100 ml Calciumgluconicum und 200 ml Magnesiumgluconicum intravenös, 20 ml Soventol, entsprechend 1000 mg Antihistamin-Wirkstoff, intramuskulär und 2 g Vitamin B₁ intramuskulär, sowie anfangs alle 3, später alle 2 Stunden jeweils 300 ml physiologische Kochsalzlösung teils intravenös, teils subkutan verabreicht. Regelmäßig wurden Herzfrequenz, Pansenmotorik und das Allgemeinbefinden beurteilt: Nach einer Stunde stellte sich bei den Tieren leichte Unruhe ein, die Herzfrequenz war von 68 Schlägen pro Minute auf 100 Schläge pro Minute beschleunigt. Gegen Ende der 2. Stunde verstärkte sich die Unruhe, die Pansenmotorik verlangsamte sich

Tabelle 6: Herzfrequenz, Pansenmotorik und Allgemeinbefinden der beiden Versuchstiere während der experimentell erzeugten Pansenazidose

Uhrzeit	Herzfrequenz (Schläge/ min)	Pansenmotorik (Bewegungen/2 min)	Allgemeinbefinden
19 ⁵⁵	68	3	ruhig
20 ⁰⁰	4 kg Zucker per fist.		
21 ⁰⁰	100	3	leichte Unruhe
22 ⁰⁰	100	2	Unruhe und Durchfall
23 ⁰⁰	90	2(3)	Unruhe und Durchfall
24 ⁰⁰	80	2(3)	leichte Unruhe, Durchfall
1 ⁰⁰	76	2	" "
2 ⁰⁰	80	2	" "
3 ⁰⁰	76	1(2)	" "
4 ⁰⁰	76	2	" "
5 ⁰⁰	72	1(2)	ruhig, Durchfall
6 ⁰⁰	80	1	" "
7 ⁰⁰	76	1	" "
8 ⁰⁰	Totalausräumung des Pansens		

Uhr- zeit	pH- Wert		Reduk- tions- zeit in Sekunden		Farbe	Geruch	Kon- sistenz	Sedimen- tation	Flota- tion	Proto- zoen
	1	2	1	2						
19 ⁵⁵	6,6	6,6	93	77	braungrün	schwach aroma- tisch	leicht visköse	normal	normal	+++
20 ⁰⁰	4 kg Zucker per fist.									
21 ⁰⁰	5,4	5,4	56	49	grün	etwas stechend	mehr flüßig	beschleu- nigt	normal	+++
22 ⁰⁰	5,4	5,4	142	120	grün	etwas stechend	wässrig	rasch	relativ schnell	++
23 ⁰⁰	5,3	5,3	123	100	grün	stechend	wässrig	rasch	ver- zögert	++
24 ⁰⁰	5,2	5,2	176	159	grüngrau	stechend	wässrig	rasch	ver- zögert	++
1 ⁰⁰	5,1	5,1	184	197	grüngrau	stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
2 ⁰⁰	5,1	5,1	13,5	12	milchig- grau	stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
3 ⁰⁰	5,1	5,1	12,5	12	milchig- grau	stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
4 ⁰⁰	5,1	5,1	15	13,5	milchig- grau	sauer- stechend	stark wässrig	sehr rasch	aus- bleibend	+-
5 ⁰⁰	4,9	4,9	20	17	milchig- grau	sauer- stechend	stark wässrig	sehr rasch	aus- bleibend	+-
6 ⁰⁰	4,8	4,8	>30	>30	milchig- grau	sauer- stechend	stark wässrig	sehr rasch	aus- bleibend	+-
7 ⁰⁰	4,8	4,8	>60	>60	milchig- grau	sauer- stechend	stark wässrig	sehr rasch	aus- bleibend	+-
8 ⁰⁰	Totalausräumung des Pansens, Magenwaschung, 3 Eimer aktiver Panseninhalt, 5 Liter Pansen- saft und 3 Heubüchel als Panseneinlage									

Tabelle 7: Ausfall der Methylenblauprobe, die pH-Werte sowie die makroskopischen und mikroskopischen Pansensaftbefunde bei experimentell erzeugter Pansenazidose (Probe 1, Schwarzbunte; Probe 2, Grauviehhuh)

von 3 auf 2 Pansenbewegungen pro 2 Minuten und Durchfall stellte sich ein. In den nachfolgenden 3 Stunden beruhigte sich das Herz der Tiere wieder auf 76-80 Schläge pro Minute, womit eine fortschreitende, allgemeine Beruhigung der Kühe verbunden war. Die Pansenmotorik nahm mit zunehmender Säuerung ab, ohne jedoch ganz zu unterbleiben; der Durchfall hielt bis Versuchsende an. Die Befunde sind in nachstehender Tabelle 6 zusammengefaßt.

12 Stunden nach Verabreichung von 4 kg Zucker über die Pansenfistel wurde der Versuch mit einer Totalausräumung und mehrmaliger Pansenwaschung mittels lauwarmen Wassers abgeschlossen. In jeden Pansen wurden 3 geknäuelte Heubüschel verbracht, der vorher mit 3 Eimern eines hochaktiven Pansensaftes beschickt worden war.

Verlauf der Methylenblaureduktion bei experimentell erzeugter Pansenazidose ohne und mit Neutralisation des entnommenen Vormageninhaltes

Nachdem sich die Pansenflora der Grauviehkühe durch mehrwöchige Verfütterung einer gemischten Heu-Kraftfütteration (siehe vorne) von der Ansäuerung des Vormageninhaltes aus dem letzten Versuch normalisiert und die Reduktionswerte der Methylenblauprobe stabilisiert hatten, wurde die Verlaufsuntersuchung bei experimentell erzeugter Pansenazidose wiederholt und dahingehend modifiziert, daß ein Teil des Vormageninhaltes unmittelbar nach der Pansensaftentnahme mit einer gesättigten Natrium-Bikarbonatlösung versetzt und dadurch auf einen pH von pH 6,9 eingestellt wurde. Mit dem anderen Teil des Pansensaftes, der unverändert zur Untersuchung kam, sollten die Ergebnisse aus dem vorhergehenden Versuch kontrolliert werden.

Am Versuchstag wurde der Pansenfistelkuh, unmittelbar vor der Applikation von 4 kg Saccharose über die Pansenfistel, Vormagensaft abgesaugt, um den Ausgangswert für die Methylenblauprobe zu ermitteln. Von 5 Uhr bis 16 Uhr wurde stündlich Pansensaft entnommen, beurteilt und die Methylenblaureduktion durchgeführt.

Einer Verkürzung der Reduktionszeit auf ein Minimum von 2 Minuten während der ersten Stunde nach Einbringen von 4 kg Zucker in den Vormagen, folgte, wie aus Tabelle 8 und Diagramm 11 hervorgeht, in den nächsten 5 Stunden eine kontinuierliche Verzögerung des Methylenblauabbaus auf 230 Sekunden. Dabei blieb es ohne Einfluß auf die Reduktionszeit, ob die

Pansensaftprobe vor Ausführung der Methylenblaureduktion mit Natriumbicarbonat neutralisiert wurde oder nicht. Ab der 7. Stunde divergierten unvorbehandelte und neutralisierte Proben. Im sauren Pansensaft verlängerte sich die Reduktionszeit auf 6 Minuten, wogegen sich der Methylenblauabbau nach pH-Anhebung auf pH 6,9 nur um 10 Sekunden auf 4 Minuten verzögerte. Eine Stunde später benötigte der nicht vorbehandelte Pansensaft 11 Minuten, der neutralisierte dagegen nur 4 1/2 Minuten zur Entfärbung der Methylenblaulösung. 9 Stunden nach Versuchsbeginn wurde bei der unbehandelten Probe eine Reduktionszeit von 23 Minuten ermittelt, während die mit Natriumbicarbonat versetzte Pansensaftprobe Methylenblau in 6 1/2 Minuten entfärbte. Um 15 Uhr letztlich stieg die Reduktionszeit im sauren Vormageninhalt auf über 60 Minuten an, wogegen sich nach pH-Korrektur die Abbauzeit nur auf 10 Minuten verlängerte.

Die pH-Kurve und der Ausfall der Methylenblauproben zeigen in der graphischen Darstellung wiederum den charakteristisch-kreuzenden Verlauf, wobei der Schnittpunkt der Kurve der Reduktionszeiten mit der pH-Linie bei einem pH von 5,0 liegt. Mit dem gleichzeitigen Abfall des pH-Wertes auf pH 4,8 nach einer weiteren Stunde geht die schlagartige Verlängerung in der unbehandelten Pansensaftprobe von 6 auf 11 Minuten einher und damit beginnend die Divergenz zwischen der nicht vorbehandelten und der neutralisierten Pansensaftprobe.

12 Stunden nach Verabreichung von 4 kg Zucker über die Pansenfistel erfolgte die Totalausräumung des Pansens mit mehrmaliger Vormagenwaschung. In den Pansen wurden anschließend 3 geknäuelte Heubüschel verbracht, nachdem er zuvor mit 3 Eimern eines voll-aktiven Pansensaftes beschickt worden war.

Da die makroskopischen und mikroskopischen Pansensaftveränderungen von den Befunden des vorherigen Versuches nur geringfügig abwichen, wird hier auf eine neuerliche ausführliche Besprechung der Ergebnisse verzichtet und auf Tabelle 8 verwiesen.

Auch bei diesem Versuch wurde den resorptiven Folgen einer Pansenazidose Rechnung getragen und die Fistelkuh in gleicher Weise wie im letzten Versuch medikamentell versorgt. Regelmäßig wurden Herzfrequenz, Pansenmotorik und das Allgemeinbefinden beurteilt. Da sich die Befunde hier weitgehend mit denen des vorangegangenen Versuches deckten, wird auf eine eingehende Besprechung verzichtet und auf Tabelle 6 (siehe vorausgehender Versuch) hingewiesen.

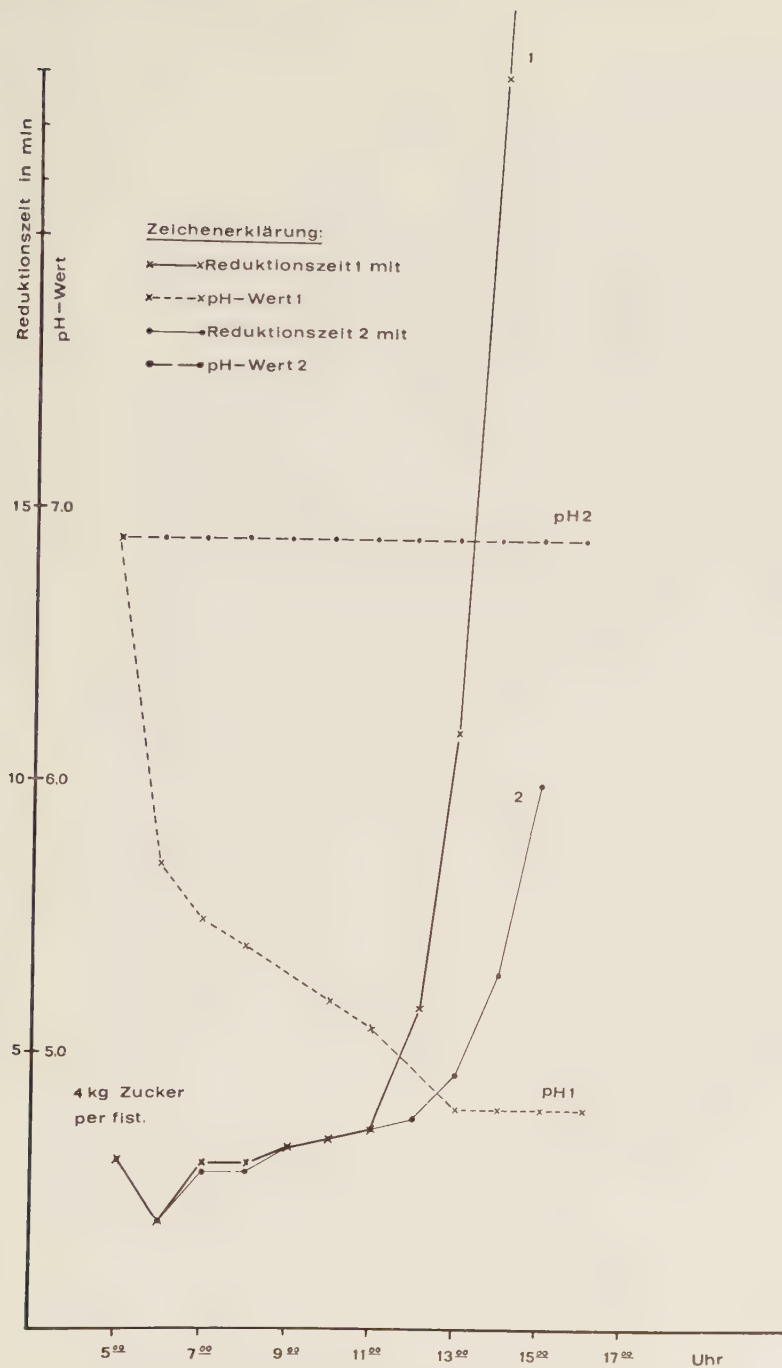


Diagramm 11: Ausfall der Methylenblauprobe und pH-Verlauf bei experimentell erzeugter Pansenazidose ohne (1) und mit (2) Neutralisation des Pansen-saftes.

Uhr- zeit	pH- Wert		Reduk- tions- zeit in Sekunden		Farbe	Geruch	Kon- sistenz	Sedimen- tation	Flota- tion	Proto- zoen
	1	2	1	2						
5 ⁰⁰	6,9	6,9	180	180	braungrün	schwach aroma- tisch	leicht viskös	normal	normal	+++
5 ⁰⁰	4 kg Zucker per fist.									
6 ⁰⁰	5,7	6,9	120	120	grün	etwas stechend	mehr flüßig	normal	normal	+++
7 ⁰⁰	5,5	6,9	180	165	mittel- grün	etwas stechend	wässrig	beschleu- nigt	relativ schnell	++
8 ⁰⁰	5,4	6,9	180	165	mittel- grün	etwas stechend	wässrig	rasch	relativ schnell	++
9 ⁰⁰	5,3	6,9	195	195	grüngrau	stechend	wässrig	rasch	ver- zögert	++
10 ⁰⁰	5,2	6,9	210	210	grüngrau	stechend	wässrig	rasch	ver- zögert	++
11 ⁰⁰	5,1	6,9	230	230	grüngrau	stechend	wässrig	rasch	ver- zögert	++
12 ⁰⁰	5,0	6,9	360	240	milchig- grau	stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
13 ⁰⁰	4,8	6,9	11 min	270	milchig- grau	stechend	wässrig	rasch	aus- bleibend	+-
14 ⁰⁰	4,8	6,9	23 min	390	milchig- grau	sauer- stechend	stark wässrig	sehr rasch	aus- bleibend	+-
15 ⁰⁰	4,8	6,9	>60 min	10 min	milchig- grau	sauer- stechend	stark wässrig	sehr rasch	aus- bleibend	+-
16 ⁰⁰	4,8	6,9	>60 min	>30 min	milchig- grau	sauer- stechend	stark wässrig	sehr rasch	aus- bleibend	+-
16 ⁰⁵	Totalausräumung des Pansens, Magenwaschung, 3 Eimer aktiver Panseninhalt, 5 Liter Pansen- saft und 3 Heubüschel als Panseneinlage									

Tabelle 8: Ausfall der Methylenblauprobe, pH-Verlauf sowie die makroskopischen und mikroskopischen Pansen-saftbefunde bei experimentell erzeugter Pansen-azidose ohne (Probe 1) und mit (Probe 2) Neutra-lisierung des entnommenen Vormageninhaltes

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß mit Hilfe der Methylenblauprobe das Aktivitätsniveau der Vormagenflora nachgewiesen werden kann. Und zwar werden bei Verabreichung einer gemischten Heu-Kraftfutterration 0,3 mg Methylenblau, entsprechend 1 ml einer 0,03prozentigen Lösung, von 20 ml eines nicht vorbehandelten Pansensaftes in längstens 3 Minuten entfärbt. Auf Veränderungen in der Futterration oder auf Vorbehandlung des Panseninhaltes reagieren die mit Methylenblau gefundenen Reduktionszeiten in gleicher Weise wie die von BROBERG (1957/1958) elektrometrisch ermittelten Daten.

Die erhaltenen Befunde lassen erkennen, daß die Methylenblaufärbung im Pansensaft analog den Gegebenheiten in der Milch und im Sperma im wesentlichen auf die Mikroorganismen und deren fermentative Einrichtungen zurückzuführen ist. Hierbei dürften jedoch nicht allein die Reduktasen zur Entfärbung führen, sondern in unbedeutendem Maße werden auch pflanzliche Enzyme oder andere Stoffe an der Reduktion beteiligt sein. Gleichzeitig spielt sich ein Konkurrenz- und Verdrängungsmechanismus während des Stoffwechselablaufs der Bakterien ab, der durch Abbinden oder Freigabe von Valenzen eine Entfärbung des Methylenblaus beschleunigt oder für eine Hemmung des Reduktionsvorganges verantwortlich gemacht werden kann (LEMBKE, KAUFMANN und LAGONI 1952). Dennoch kann die Reduktionsdauer als ein grober Gradmesser für die biochemische Verdauungsaktivität der Vormagenflora und -fauna gedeutet werden, wenn nicht schon eine sinnfällige Verderbnis des Pansensaftes vorliegt.

Die starke Verlängerung der Reduktionszeit bei Strohütterung einerseits, bei der die Keimzahlen im Pansen bis auf die Hälfte reduziert sind, und die rasche Verkürzung der Entfärbedauer bei Verabreichung leicht verdaulicher Futtermittel andererseits, wobei der Bakteriengehalt des Vormagens ansteigt, lassen vermuten, daß bei pH-Werten zwischen pH 6,0 und pH 7,0 aus der Reduktionszeit auf die Zahl der Vormagenkeime rückgeschlossen werden kann. Ob und in welchem Rahmen solche Beziehungen bestehen, wird sich vielleicht aus den bereits laufenden und noch weiter durchzuführenden Keimzahlbestimmungen ergeben.

Wie bei den elektrometrischen Untersuchungen BROBERGS (1957) kommt die

pH-Abhängigkeit des Redoxpotentials auch in den vorliegenden Versuchsergebnissen zum Ausdruck, indem der Pansensaft bei Absinken des pH-Wertes auf Säuregrade um pH 5,0 und tiefer nicht mehr in der Lage ist, ein konstantes rH-Niveau aufrecht zu erhalten. BROBERG (1957) ist der Ansicht, daß die Regulation des Redox-Niveaus, bakteriell und enzymatisch bedingt, auf einer Hemmung der Bakterienaktivität und einer Zerstörung der Enzymsysteme beruht. Offenbar tritt diese Reduktionshemmung unabhängig von der Zahl der Pansenmikroorganismen auf. Deshalb ist es nicht möglich, die Methylenblaufärbung allein, ohne vorhergehende pH-Korrektur bei Säuregraden um pH 5,0 und tiefer, zur Schätzung der Keimzahl im Vormagen heranzuziehen.

Unterbleibt eine Neutralisation des Pansensaftes, so deutet eine schlagartige Verzögerung der Reduktionszeit auf eine Verschiebung der Keimarten zugunsten einer stark säurebildenden, überwiegend grampositiven Flora hin, was auf einen pathologischen Befund hindeutet. Verbindet man die Methylenblauprobe deshalb mit einer Messung des pH-Wertes und erhebt makroskopische und mikroskopische Veränderungen bezüglich Farbe, Geruch, Konsistenz, Sedimentation und Flotation sowie bezüglich des Infusoriengehaltes, kann die Methylenblauprobe bei der Diagnosestellung der Pansenazidose wertvolle Dienste leisten.

Wird der pH-Wert eines sauren Vormageninhaltes wieder über pH 6,0 angehoben, was bei leichteren Azidosen durch die ständig zufließenden Speichelskarbonate geschieht, so werden zwar nicht die extrem langen Abbauzeiten gemessen, jedoch ist die Entfärbedauer im Vergleich zu den sonst bei zucker- und stärkereichen Rationen gefundenen Normalwerten in dem Maße verzögert, daß die Methylenblauprobe noch diagnostisch verwertbar ist.

Hinsichtlich der Auswirkungen der oralen Antibiotika-Applikation ist bemerkenswert, daß erst nach der verhältnismäßig hohen Dosis von 10 g Chlorotetrazyklin eine auffällige Verlängerung der Reduktionszeit zu bemerken war und daß sich die Abbauzeit bereits am 3. Tag post applicationem wieder normalisierte, obgleich noch makroskopisch Pansensaftveränderungen im Sinne einer Inaktivierung vorlagen. Nach den Untersuchungen von HORSTMANN (1956) war mit Hilfe der üblichen klinischen Pansensaftuntersuchungen die stärkste Inaktivität am 3. Tag nach einmaliger Aureomycin-Verabreichung (4,5 – 7,5 g) festzustellen. Die eigenen Beobachtungen scheinen demnach von den Ergebnissen HORSTMANNs (1956) sowie von ähnlichen Befunden anderer Untersucher (BRAMBILLA und Mitarbeiter, 1968; ANDERSON,

1953) abzuweichen. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Methylenblauprobe in dieser Form nur ein verhältnismäßig grob reagierender (Schnell-) Test sein kann und auch als nichts anderes gedacht ist. Außerdem spielt bei Versuchen in vivo die Ausgangslage der Pansenflora, die bei den beiden, auf einer gemischten Ration gehaltenen Versuchstieren offenbar auf einem hohen Aktivitätsniveau stand, eine wesentliche Rolle. An anderer Stelle wird auf die unterschiedliche Hemmwirkung der verschiedenen Antibiotika auf die einzelnen Keimarten verwiesen (TURNER und HODGETTS, 1953; WANG und Mitarbeiter, 1968 und 1969). Schließlich ist zu bedenken, daß die Methylenblauprobe nichts über die Art der reduzierenden Flora, die vor und nach einer Antibiotikaeinwirkung ganz verschieden sein kann, aussagt.

Die einleitend gestellte Frage nach der Brauchbarkeit der Methylenblauprobe für die klinische Pansensaftuntersuchung kann nach Auswertung der bislang vorliegenden Befunde dahingehend beantwortet werden, daß sich der Methylenblautest zur Diagnose oft schwer erkennbarer, einfacher Aktivitätsminderungen, wie sie nach Inappetenz, Mangelzuständen und nach Aufnahme keimhemmender Substanzen beobachtet werden, eignet. Auch kann die Probe bei der Erkennung und Verlaufskontrolle von akuten Pansenazidosen mit Vorteil eingesetzt werden.

Zur Pansensaftbeurteilung darf jedoch nicht auf die Erhebung anderer feststellbarer Kriterien der klinischen Pansensaftuntersuchung verzichtet werden. Die Methylenblauprobe kann nur als ein weiteres Kriterium bei der Beurteilung von Vormageninhalt verstanden werden und soll in keinem Fall den bisherigen Untersuchungsangang ersetzen.

Um eindeutige, auswertbare Resultate zu erzielen, müssen die weiteren Bestrebungen auf diesem Gebiet darauf gerichtet sein, Entnahmeinstrumente zu entwickeln, die die Gewinnung einer speichelfreien oder zumindest speichelarmen Pansensaftprobe, am besten aus dem ventralen Pansensack, gewährleisten.

Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen verfolgten das Ziel, die aus der Milchuntersuchung und der Spermatologie bekannte und 1965 auch in die klinische Pansensaftuntersuchung eingeführte Methylenblaureduktionsprobe zu einem Schnelltest zu modifizieren und unter verschiedenen Fütterungsbedingungen bzw. pathologischen Zuständen zu prüfen.

In Vorversuchen zur Einstellung der Methylenblauprobe als Schnelltest wurde:

1. mit verschiedenen Methylenblaukonzentrationen experimentiert: bei Vorlage von 20 ml Pansensaft hatte sich 1 ml einer 0,03prozentigen Methylenblaulösung (entsprechend 0,3 mg Methylenblau DAB 7) als Redoxfarbstoff als geeignet erwiesen.
2. Pansensaft aufgekocht und mit Methylenblaulösung versetzt: eine Reduktion des Farbstoffes fand nicht statt.
3. Pansensaft mit einigen Tropfen einer 10prozentigen Formalinlösung beschickt: auch hier wurde Methylenblau nicht entfärbt.

In Hauptversuchen wurde die Reduktionszeit bei unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen und bei verschiedener Fütterung, nach Antibiotikagaben und nach Erzeugung einer Pansenazidose ermittelt:

1. Bei unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen traten hinsichtlich der Entfärbedauer Differenzen auf. Gleichzeitig stieg die Reduktionszeit mit dem zeitlichen Abstand von der Pansensaftentnahme an.
2. Noch 24 Stunden nach Verabreichung einer gemischten Heu-Kraftfütterung wurde Methylenblau vom Pansensaft in längstens 3 Minuten entfärbt.
3. Bei reiner Heufütterung verlängerte sich die Reduktionszeit bis zum 5. Tag und pendelte sich zwischen 17 und 20 Minuten ein.
4. Bei reiner Strohütterung verzögerten sich die Entfärbezeiten bis zum 3. Tag auf Werte zwischen 15 und 17 Minuten. Zulage von Soja-Schrot bewirkte innerhalb eines Tages eine rasche Verkürzung.

5. Durch Applikation steigender Mengen von Aureomycin an aufeinanderfolgenden Tagen wurde die biochemische Aktivität des Panseninhaltes vorübergehend geschwächt. Nach Verabreichung von 10 g Chlortetrazyklin wurde noch bis zum 3. Tag durch verlängerte Reduktionszeiten eine verminderte Aktivität des Vormagensystems nachgewiesen.
6. Im Verlauf einer experimentell erzeugten Pansenazidose verzögerten sich die Reduktionswerte bis zu einem pH von 5,0 nur langsam. Zwischen pH 5,0 und pH 4,8 ließ die Reduktionskraft des Pansens stark nach. Durch vorausgegangene Neutralisation des Vormageninhaltes auf pH 6,9 konnte der starke Abfall der Reduktionskraft merklich aufgefangen, eine allmähliche Verzögerung der Werte jedoch nicht verhindert werden.

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen erscheint es berechtigt festzustellen, daß dem Kliniker und Praktiker mit der Methylenblauprobe ein diagnostisches Hilfsmittel in die Hand gegeben ist, das geeignet ist, im Verein mit anderen Untersuchungsverfahren (pH-Wert, Farbe, Geruch, Konsistenz, Sedimentation und Flotation und Infusoriengehalt) die Diagnose einfacher Störungen der Pansenaktivität, die mit einer Beeinträchtigung des Reduktionsvermögens einhergehen, sowie die Diagnose von Pansenazidosen zu erhärten.

Summary

The present investigations were conducted with the aim of modifying the methylene-blue reduction test known from the fields of milk examination and spermatozoology and introduced into clinical analysis of rumen fluid in 1965 into a screening test and examine the methylene-blue reduction test under a variety of nutritional and pathological conditions.

Preliminary experiments to adjust a screening method included the following:

1. Experiments were made with several concentrations of methylene-blue: with a sample of 20 ml of rumen fluid, 1 ml of a 0.03 per cent methylene-blue solution (corresponding to 0,3 mg of DAB 7 methylene-blue) was found to be a satisfactory dye.
2. No reduction of dye was observed when the methylene-blue solution was treated with boiled rumen fluid.
3. The methylene-blue dye did not fade, either, when some drops of a 10% formalin solution were added to the rumen contents.

In the actual series of experiments the reduction times were established for varying sample storage and feeding conditions, for antibiotic dosing and after inducing rumen acidosis:

1. Reduction times varied with storage conditions. At the same time the reduction time increased in proportion to the time intervals of rumen fluid samples.
2. As long as twenty-four hours after administering a mix of hay and concentrated feed, the methylene-blue was reduced by the rumen contents within three minutes at the most.
3. With a pure hay diet the reduction time increased until the fifth day and adjusted itself to periods between 17 and 20 minutes.
4. With a pure straw diet the reduction periods were prolonged to 15 till 17 minutes within three days. Supplement of soybean meal resulted in a marked shortening of that period within one day.

5. By applying increased quantities of aureomycin on successive days the biochemical activity of the rumen contents was temporarily decreased. After administering 10 g of chlortetracycline a reduced activity of the ruminal system was indicated by extended reduction periods until the third day.
6. In the course of an experimentally induced rumen acidosis the reduction values increased only slowly down to pH 5,0. Between pH 5,0 and 4,8 the reductive capacity of the rumen was substantially weakened. While the sudden decrease in reductive power could be significantly slowed down by preceeding neutralization of the rumen contents to pH 6,9, a gradual retardation of the reduction times could not be prevented.

According to the available results of these tests it appears justified to conclude that both the clinician and the practitioner will find the methylene-blue test a suitable tool – in combination with other methods, such as pH, color, smell, consistency, sedimentation, flotation and counts of protozoa – for the diagnosis of simple disturbances of rumen activity accompanied by an impaired reductive ability and of rumen acidosis.

Literaturverzeichnis

- ANDERSON, P. (1953), Nord. Vet.-Med. 5, 636–652
- ANNISON, E. F. (1954), Biochem. J. 57, 400
- ANNISON, E. F. (1957), Biochem. J. 66, 592
- ANNISON, E. F. und LEWIS, D. (1959), Metabolism in the rumen, Methuan and Co. Ltd. London
- BALCH, C. C. und KELLY, A. (1950), Br. J. Nutr. 4, 395
- BALDWIN, R. L. und EMERY, R. S. (1960), J. Dairy Sci. 43, 506
- BARNETT, A. J. und Mit. (1957), J. Agric. Sci. 49, 171
- BLACKBURN, T. H. und HOBSON, P. N. (1962), J. gen. Microbiol. 29, 69–81
- BRAMBILLA, E., MELGRATI, E. und PAGANI, G. (1968), K- und Procain-Penicillin G per os und die Produktion von flüchtigen Fettsäuren bei mit Heu gefütterten Rindern. Ber. V. Internationale Tagung über Rinderkrankheiten. Opatja; Ref. und Beitr. 433–435
- BRIGGS, P. K., HOGAN, J. P. und REID, R. L. (1957), Austral. J. Agric. Res. 6, 674 und 8, 691
- BROBERG, G. (1956), Nord. Vet. Med. Bd. 8, 935
- BROBERG, G. (1957), Nord. Vet. Med. Bd. 9, 918–950
- BROBERG, G. (1957), Nord. Vet. Med. Bd. 9, 57–60
- BROBERG, G. (1958), Nord. Vet. Med. Bd. 10, 263–268
- BROBERG, G. (1959), Akute Überfütterung mit kohlenhydratreichem Futter bei Wiederkäuern. XVI. Int. tierärztlicher Kongreß Madrid
- BRODY, S., STEWART, R. E. und DALE, H. E. (1955), J. Animal Sci. 14, 1243
- BROGMUS, H. (1950), Über die Beeinflussung der Reduktaseprobe in Milch durch besondere Bakterienarten bei Anwendung der Methylenblauprobe, Janusgrünprobe, Resazurinprobe und der Resazurin-Natriumprobe. Vet. Med. Diss. Hannover
- BRÜGGEMANN, J. und GIESECKE, D. (1963), Z. Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde 18, 215
- BRYANT, M. P. (1959), Bact. Rev. 23, 125
- CARROL, E. J. und HUNGATE, R. E. (1954), Appl. Microbiol. 2, 205
- CHRISTIANSEN, W. (1926), Mol. Ztg. 40, 1819

- CUNNINGHAM, M. D., MARZT, F. A. und MERILAN, C. P. (1964), J. Dairy Sci. 47, 382
- DAIN, J. A., NEAL, A. L. und DOUGHERTY, R. W. (1955), J. Animal Sci. 14, 930
- DALE, H. E., STEWART, R. E. und BRODY, S. (1954), Cornell Vet. 44, 368
- DANE, E. und WILLE, F. (1961), Kleines chemisches Praktikum, 2. Auflage, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Bergstraße
- DIRKSEN, G. und WOLF, L. (1963), Tierärztliche Umschau 18, 282–285
- DIRKSEN, G. (1965), Vet. Med. Rev. Bayer, Heft 2, 98–125
- DIRKSEN, G. (1966), Beitrag zur Biochemie der Pansenazidose des Rindes. IV. Internationale Tagung der Weltgesellschaft für Buiatrik in Zürich
- DIRKSEN, G. (1967), Schweiz. Arch. Tierheilkunde 109, 28–34
- DURAN del CAMPO, A. und de BONI, C. (1962), Rev. Med. Vet. Montevideo 11, 11
- EHRSTRÖM, W. (1920), Beitrag zur Kenntnis der Reduktaseprobe, Vet. Med. Diss. Dresden
- FALK, J. E., LEMBERG, R. und MORTON, K. (1961), Hämatin Enzymes, Pergamon Press. Oxford
- GEHARDT, H. (1964), Grundriß der Pharmakologie und Toxikologie und der Arzneiverordnungslehre. 19. Auflage, Verlag von Rudolph Müller und Steinicke, München
- GIESECKE, G. und TIEWS, J. (1966), Vet. Med. Nachrichten Bayer, Heft 3, 161–179
- GILCHRIST, F. M. C. und CLARK, R. (1957), J. S. Afric. Vet. Med. Ann. 28, 295
- GRANICH, S. und MAUZERALL, D. in GREENBERG, D. M. (1961), Metabolic Pathways, Volume II, Academic Press, New York and London
- HEILEMANN, D. (1960), Archiv für Tierernährung 2, 113–128
- HOFLUND, Sv., QUIN, J. I. und CLARK, R. (1948), Onderstepoort J. Vet. Sc. 23, 395–409
- HOFLUND, Sv. (1959), Dtsch. tierärztl. Wschr. 66, 578–582
- HOFLUND, Sv. und KARLSON, L.-F. (1963), Veränderung der Pansenproben während der Zeit zwischen der Probenentnahme und der chemischen Untersuchung. Kongreßberichte XVII. Welttierärztekongreß Hannover, Bd. II. 1379–1380
- HOLLMANN, S. (1961), Nicht glykolytische Stoffwechselvorgänge der Glukose, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- HOLTENIUS, P. (1957), *Acta Agriculturae Scandinavia* 7, 123–163
- HOLTENIUS, P., BJÖRCK, G. und HOFLUND, Sv. (1959), *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 66, 554–558
- HORSTMANN, G. (1956), Untersuchung des Pansensaftes gesunder Rinder bei Weidegang und Stallfütterung sowie nach Behandlung mit antibiotischen Mitteln, Diss. Hannover
- HUNGATE, R. E. (1950), *Bact. Rev.* 14, 1–49
- HUNGATE, R. E., DOUGHERTY, R. W., BRYANT, M. P. und CELLO, R. M. C. (1952), *Cornell Vet.* 42, 423
- HUNGATE, R. E. und SMITH, P. H. (1958), *J. Ani. Sci.* 15, 485
- JENSEN, N. O. (1937), *Zbl. Bakter. II*, 96, 110
- KARLSON, P. (1966), *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler* Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- KAUFMANN, W. (1959), *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, Bd. 11, Heft 4, 297–303
- KAUFMANN, W. und ORTH, A. (1966), *Zschr. Tierphysiol. Tierernährung, Futtermittelkunde* 21, 110–120
- KIRCHGESSNER, M. (1970), *Tierernährung*, DLG-Verlag, Frankfurt/Main
- KISTNER, A. (1960), *J. gen. Microbiol.* 23, 565–576
- KLIMMER, M. und SCHÖNBERG, F. (1951), *Milchkunde und Milchhygiene*, Verlag M. und H. Schaper, Hannover
- KOLB, E. (1959), *Berl. Münchn. tierärztl. Wschr.* 72, 384–388
- KOLB, E. (1962), *Lehrbuch der Physiologie der Haustiere*, Fischer Verlag, Jena
- KROGH, N. (1959/60/61), *Acta Vet. Scand.* 1, 74–97, 383–410; *Acta Vet. Scand.* 2, 103–119, 357–374
- KROGH, N. (1963), *Acta Vet. Scand.* 4, 27–40
- KROGH, N. (1963), *Acta Vet. Scand.* 4, 41–51
- KÜHN, R. und JERCHEL, D. (1941), *Ber. dtsch. chem. Gesellschaft II, Abt. B* 74, 941
- LAGONI, H. (1951), *Milchwissenschaft* 6, 130 und 162
- LAMPILA, M. (1955), *J. Sci. Agric. Soc. Finland* 27, 142
- LEMBKE, A., KAUFMANN, W. und LAGONI, H. (1952), *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, Bd. 4, Heft 3, 361–376
- MACKENZIE, D. D. S. (1967), *J. Dairy Sci.* 50, 1772–1786
- MANGOLD, E. (1929), *Handbuch der Ernährung und des Stoffwechsels der landwirtschaftlichen Nutztiere*, Bd. 2, Verlag Julius Springer, Berlin

- MARSTON, H. R. (1948), *Biochem. J.* 42, 564–574
- MEYER, H. (1958), *Futter und Fütterung* 9, 75–78
- MEYER, H. (1960), *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 67, Heft 2, 47–50
- MÜLLER, P. Th. (1906), *Arch. Hyg.* 56, 108
- MYBURGH, S. J. und QUIN, J. I. (1943), *Onderstepoort J. Vet. Sci. An. Ind.* 18, 119
- NETTER, H. (1951), *Biologische Physikochemie*, Akademische Verlagsgesellschaft Athenaion, Potsdam
- ORTH, A. und KAUFMANN, W. (1961), *Die Verdauung im Pansen und ihre Bedeutung für die Fütterung der Wiederkäuer*, Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin
- PHILLIPSON, A. T. (1942), *J. Exp. Biol.* 19, 186–198
- PHILLIPSON, A. T. und McANALLY, R. A. (1942), *J. Exp. Biol.* 19, 199–214
- PHILLIPSON, A. T. (1952), *Brit. J. Nutrition* 6, 190
- PHILLIPSON, A. T. (1958), *Digestion in the Ruminant*, 6. An. Res. Conference (Pfizer) Chicago, 125
- ROEDER, G. (1954), *Grundzüge der Milchwirtschaft und des Molkereiwesens*, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- ROLLE, M. und PESCHEK, J. (1956), *Berl. Münchn. tierärztl. Wschr.* 69, 248–250
- RÖMPP, H. (1950), *Chemie Lexikon Bd. II, L–Z*, Franck'sche Verlagshandlung Stuttgart
- ROSENBERGER, G. (1963), *Vet.-Med. Nachrichten (Bayer)*, Heft 2/3, 114–126
- ROSENBERGER, G. (1964), *Die klinische Untersuchung des Rindes*, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- ROSENBERGER, G. (1969), *Krankheiten des Rindes*, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- SANTOMAURO, A., ARRAGUNDE, M. C. und BARRIOLA, B. J. (1968), *Vet.-Med. Nachrichten (Bayer)*, Heft 1, 53–60
- SCHEUNERT, A. und TRAUTMANN, A. (1965), *Lehrbuch der Veterinärphysiologie*, Verlag Paul Parey in Berlin und Hamburg
- SCHMIDT, H. (1906), *Arch. Hyg.* 58, 313
- SCHÖNBERG, F. (1951), *Lebensmitteltierarzt* 2, 52
- SCHÖNBERG, F. (1956), *Milchkunde und Milchhygiene*, 7. Auflage, Verlag Schaper, Hannover
- SCHÖNHERR, W. (1965), *Tierärztliche Milchuntersuchung*, Hirzel-Verlag, Leipzig

- SMITH, P. H. und HUNGATE, R. E. (1958), J. Bact. 75, 713
- STEPP, W., KÜHNAU, J. und SCHRÖDER, H. (1957), Die Vitamine und ihre klinische Anwendung, Bd. 1 und 2, Enke Verlag, Stuttgart
- TURNER, A. W. und HODGETTS, V. E. (1949/1953), Toxicity of large rations of wheat, Commonwealth Sci. Industr. Res. Org. Ann. Rep. Australia
- TURNER, A. W. und HODGETTS, V. E. (1953), Austr. J. Agr. Res. 3, 453
- WANG, C. L., BALDWIN, B. und FULGHUM, R. S. (1968), Bacteriol. Proc. A, 98
- WANG, C. L., BALDWIN, B., FULGHUM, R. S. und WILLIAMS, P. P. (1969), Appl. Microbiol. 18, 677-679
- ZINN, R. (1938), Tierärztl. Rundschau, 421

Lebenslauf

Am 14. Januar 1944 wurde ich als Sohn von Alfred Mahler und seiner Frau Ursula, geb. Hecke, in Ostrowo/Polen geboren.

Bis 1949 lebte ich in Krefeld. Die Volksschule, die ich in Ludwigsburg absolvierte, schloß ich 1954 ab. Meine Oberschulzeit verbrachte ich im Landschulheim Schondorf am Ammersee und legte hier 1964 mein Abitur ab. Noch im selben Jahr immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, um Tiermedizin zu studieren. Im Juli 1966 bestand ich die Tierärztliche Vorprüfung, beendete im Juli 1969 meine Examensprüfungen und erhielt am 13. Juli 1970 die Bestallung als Tierarzt. Seit September 1969 arbeite ich in Grafing bei München als Assistent in einer Großtierpraxis.

